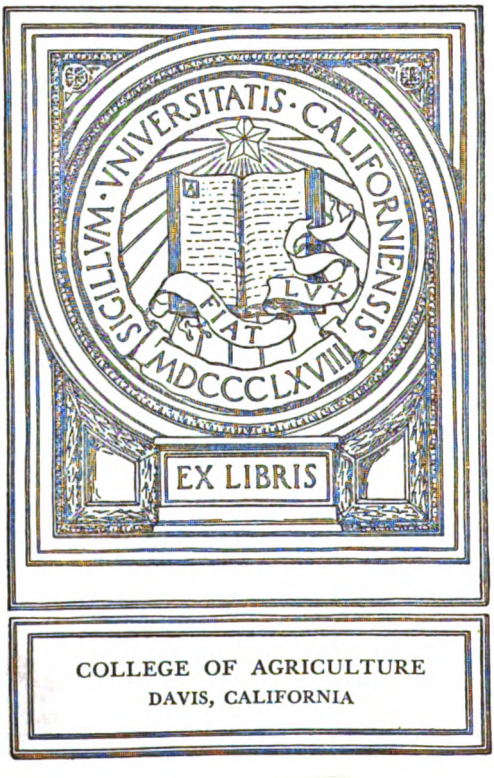
UC-NRLF
$B 650 586



COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS, CALIFORNIA

PROF. DR. L. MICHAELIS

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Breslau, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. E., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Pavia, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, Chr. Bohr-Kopenhagen, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Zürich, A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, G. Embden-Frankfurt a. Main, S. Flexner-New York, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, U. Friedemann-Berlin, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolf-Buenos-Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. von Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, W. Loeb-Berlin, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, J. Morgenroth-Berlin, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Prag, Ch. Porcher-Lyon, F. Rechmann-Breslau, P. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, Zd. H. Skraup-Wien, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, A. Stutzer-Königsberg i. Pr., F. Tangl-Budapest, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, J. Traube-Charlottenburg, A. J. J. Vandevelde-Gent, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Sechsundzwanzigster Band.

PROF. DR. L. MICHAELIS

Berlin
Verlag von Julius Springer.
1910.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Rosenthaler, L. Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen. III. 1

Rosenthaler, L. Zur Spaltung racemischer Cyanhydrine durch Emulsin. 7

Rosenthaler, L. Eiweiß als Schutzmittel für Enzyme 9

Schloßmann, Arthur und Hans Murschhauser. Der Grundumsatz und Nahrungsbedarf des Säuglings gemäß Untersuchungen des Gasstoffwechsels 14

Fränkel, Sigmund. Über Lipoide. X. 41

Fränkel, Sigmund. Über Lipoide. XI. 44

Fränkel, Sigmund. Über Lipoide. XII. 53

Ascoli, G. und L. Preti. Über alimentäre Gesetzmäßigkeiten der Acetonurie 55

Hamburger, H. J. Zur Biologie der Phagocyten. VII. 66

Liefmann, H. und M. Cohn. Beiträge zur Hämolyse durch Lipoide. 85

Kondo, Kura. Zur Kenntnis der Chondroitinschwefelsäure 116

Philosophow, Peter. Die Bildungsstätte der Uraminosäuren 131

Mancini, Stefano. Über die Zusammensetzung und einige Eigenschaften der weißen Blutkörperchen 140

Mancini, Stefano. Über den Restkohlenstoff des Blutes 149

Andersen, A. C. Über die Bangsche Methode der Zuckerbestimmung und die Haltbarkeit der hierzu verwendeten Titerflüssigkeiten . . 157

Wolf, C. G. L. und Mc Kim Marriot. Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff im Blut 165

Buchner, Eduard und Hugo Hahn. Über eine Antiprotease im Hefepreßsaft 171

Fürth, O. v. und D. Charnass. Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittlung der daraus abspaltbaren Aldehydmenge. 199

Lebedew, A. v. Bemerkungen zu den „Studien über Kataphorese von Fermenten und Kolloiden" von H. Iscovesco 221

Bacmeister. Untersuchungen über Cholesterinausscheidung in menschlichen Gallen 223

Löb, Walther und Georg Pulvermacher. Zur Kenntnis der Zuckerspaltungen. Nachtrag: Über die Zuckersynthese aus Formaldehyd 231

Kondo, Kenro. Zur Kenntnis der in Essigäther löslichen Stoffe tierischer Organe und ihres Verhaltens bei der Autolyse. I. . . 238

Kondo, Kenro. Zur Kenntnis der in Essigäther löslichen Stoffe tierischer Organe und ihres Verhaltens bei der Autolyse. II. . . 243

Kondo, Kenro. Zur Kenntnis der in Essigäther löslichen Stoffe tierischer Organe und ihres Verhaltens bei der Autolyse. III. 252

61877

Seite

Henze, Martin. Über den Einfluß des Sauerstoffdrucks auf den Gaswechsel einiger Meerestiere 255

Loeb, Jacques. Über die Hemmung der Giftwirkung von Hydroxylionen auf das Seeigelei mittels Cyankalium 279

Loeb, Jacques. Über die Hemmung der Giftwirkung von Hydroxylionen auf das unbefruchtete Seeigelei mittels Sauerstoffmangel. 289

Bang, Ivar. Untersuchungen über die Guanylsäure 293

Freund, Ernst und **Gisa Kaminer.** Über die Beziehungen zwischen Tumorzellen und Blutserum 312

Baum, Fritz. Über eine einfache Darstellung von reinem Cyanamid. 325

Jacoby, Martin. Über die immunisatorische Anreicherung von Entwicklung anregenden Serumsubstanzen 333

Jacoby, Martin. Über das Verhalten der Sperma- und Eienzyme bei der Befruchtung und ersten Entwicklung . . . . . 336 u. 536

Neuberg, C. Weitere Beiträge zur Chemie der Geschwülste. VII. . 344

Glaeßner, K. und **A. Stauber.** Ergänzung zur Arbeit: Beziehungen zwischen Trypsin und Erepsin 350

Palladin, W. und **E. Stanewitsch.** Die Abhängigkeit der Pflanzenatmung von den Lipoiden 351

Ascher, Karl. Über das Vorkommen und den Nachweis des Allantoins im Menschenharn 370

Lyttkens, H. und **J. Sandgren.** Über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Kaninchenblut 382

Reach, Felix. Beitrag zur Physiologie des Winterschlafes 391

Fürth, Otto v. und **Emil Lenk.** Über einige Versuche zum Abbaue der Cholsäure. II. 406

Fürth, Otto v. und **M. Friedmann.** Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente 435

Hirokawa, Waichi. Über den Einfluß langdauernder Nucleinsäurefütterung auf den Purinstoffwechsel und die Allantoinausscheidung beim Hunde 441

Trunkel, Hans. Über Leim und Tannin 458

Trunkel, Hans. Über das optische Drehungsvermögen des Leims . . 493

Neuberg, C. und **H. Pollak.** Über Phosphorsäure- und Schwefelsäureester von Kohlenhydraten 514

Neuberg, C. und **H. Pollak.** Über die Phosphorylierung von Eiweiß und die Bindung des Phosphors in den natürlichen Phosphorproteinen 529

Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen.

III. Mitteilung.

Von

L. Rosenthaler.

(Mitteilung aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 12. April 1910.)

σ- und δ-Emulsin.

Durch die bisher mitgeteilten Beobachtungen und Schlußfolgerungen[1]) konnte bereits die Tatsache als gesichert gelten, daß derjenige Bestandteil des Emulsins, der Amygdalin in Benzaldehyd, Blausäure und Glucose spaltet (δ-Emulsin), nicht identisch ist mit demjenigen, der die asymmetrische Gestaltung der Nitril-Synthese herbeiführt (σ-Emulsin). Es war wiederholt gelungen, Präparate zu erhalten, die noch spalteten, aber nicht mehr synthetisierten; andererseits verliert eine Emulsinlösung, die man unter bestimmten, früher mitgeteilten Bedingungen erhitzt, die Fähigkeit, Amygdalin zu spalten, während es noch möglich ist, mit ihr d-Benzaldehydcyanhydrin zu erhalten. Indessen fehlte es immer noch an einem glatten Verfahren zur Gewinnung des σ-Emulsins. Die Auffindung eines solchen war aber schon deswegen sehr erwünscht, als man hoffen darf, mit einem vom δ-Anteil freien σ-Emulsin manche Synthesen auszuführen, die auf anderem Wege nicht so leicht oder gar nicht erreichbar sind.

Es wurde deshalb noch eine Anzahl von Versuchen angestellt, um, wenn möglich, neue und ihre Trennung ermöglichende Unterschiede der beiden Emulsinbestandteile aufzufinden.

1. Theoretisch bot sich zunächst folgender Weg: Da bei der Einwirkung des σ-Emulsins auf Benzaldehyd und Blau-

[1]) Diese Zeitschr. 14, 238, 1908 und 17, 257, 1909.

säure anscheinend ein Verbrauch des σ-Emulsins stattfindet, so schien es möglich, durch fortgesetzte Einwirkung neuer Mengen Benzaldehyd und Blausäure schließlich das σ-Emulsin zu verbrauchen und das δ-Emulsin übrig zu behalten. Der Versuch verlief negativ. Als endlich die synthetisierende Wirkung des Emulsins erschöpft war, war auch die spaltende Wirkung verschwunden, sei es weil das δ-Emulsin durch die fortgesetzte Einwirkung von Benzaldehyd und Blausäure zerstört wird, sei es weil es durch die gleichzeitig stattfindende Spaltung des d-Benzaldehydcyanhydrins ebenfalls verbraucht wird.

2. Lange Einwirkung des Lichtes (7. August bis 8. September) zerstört beide Emulsinanteile ($1\,\%$ige Emulsinlösung), ohne daß die Zersetzungsgeschwindigkeit der beiden Enzyme wesentlich verschieden wäre.

3. Gegen Fäulnis sind beide Enzyme verhältnismäßig beständig. In einer bereits stark verfaulten, 14 Tage alten Lösung war weder das σ- noch das δ-Emulsin zerstört.

4. Durch die Chamberland-Kerze gehen beide Enzyme hindurch.

5. Dialyse tritt bei beiden allmählich ein. Verwendet wurden die Dialysierhülsen von Schleicher und Schüll, Düren.

6. Wasserstoffperoxyd zerstört σ- und δ-Emulsin. Zunächst wird allerdings das Peroxyd selbst zersetzt. Gibt man aber von letzterem so viel hinzu, daß es nach mehrtägigem Stehen noch nachzuweisen ist, und zerstört dann den Überschuß durch vorsichtigen, unter Kühlung erfolgenden Zusatz von Ferrosulfat, so tritt keine der beiden Emulsinwirkungen mehr ein.

7. Mit Chlornatrium war weder bei Halb- noch bei Ganzsättigung eine Trennung zu erzielen.

8. Die Einwirkung von Formaldehyd, die bereits in der zweiten Mitteilung behandelt war, wurde nochmals untersucht. Damals war festgestellt worden, daß kleine Mengen Formaldehyd dem σ-Emulsin verhältnismäßig wenig schaden, wenn, wie ergänzend bemerkt sei, der Zusatz von Benzaldehyd und Blausäure unmittelbar nach dem des Formaldehyds erfolgt. Etwas größere Mengen von Formaldehyd zerstören indes die Wirkungen beider Enzyme. Setzt man zu einer Lösung von 0,6 g Emulsinin 55 g Wasser und 5 g der offizinellen Formaldehydlösung, so sind schon nach 5 Minuten beide Enzyme bis auf minimale Reste unwirksam gemacht.

9. Die Lösung von 2 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 3 g Natriumacetat in 20 g Wasser erzeugt in Emulsinlösung einen Niederschlag. Entfernt man das in kleinem Überschuß zugesetzte Phenylhydrazin durch Benzaldehyd, so zeigt das Filtrat sowohl die σ- als die δ-Wirkung.

10. Mercuriacetat gibt ebenfalls eine Fällung. Das Filtrat spaltet nicht und synthetisiert nicht.

11. Dreitägige Einwirkung von 10 ccm gesättigter Lösung von arseniger Säure auf eine Lösung von 0,6 g Emulsin in 50 g Wasser zerstört keines der beiden Enzyme.

12. Gegenüber adsorbierenden Mitteln, wie sie Michaelis und Ehrenreich[1]) zur Adsorptionsanalyse verwenden, verhalten sich beide Emulsinbestandteile in derselben Weise. Beide werden durch Tonerde und dialysiertes Eisen adsorbiert; sie werden nicht adsorbiert durch Kaolin und kolloidales Schwefelarsen. Beide Enzyme haben somit den Charakter saurer Substanzen.

13. Kupferhydroxyd (frisch gefällt und bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion ausgewaschen) adsorbiert (oder bindet) beide Enzyme nahezu quantitativ. Der Versuch mit Kupferhydroxyd war aus folgender Erwägung heraus angestellt. Läßt man Kupfersulfat auf Emulsinlösung einwirken, so enthält das Filtrat nur δ-Emulsin, wie bereits früher berichtet. Dabei ist jedoch eine Säurewirkung nicht auszuschließen, teils deshalb, weil Kupfersulfat selbst sauer reagiert, teils deshalb, weil bei einer Bindung von Kupfer an Eiweiß mit einem Freiwerden von Schwefelsäure zu rechnen ist. Für die Beurteilung der Natur der Enzyme schien es von Interesse, festzustellen, ob sie in der Tat an Metalle gebunden werden können. Wenn indes auch, wie oben angegeben, eine Bindung durch Kupferhydroxyd erfolgt, so ist doch die Frage offen gelassen, welcher Art diese Bindung ist. Die unter 12. wiedergegebenen Beobachtungen sprechen allerdings dafür, daß es sich um eine chemische Bindung handelt.

14. Die im vorhergehenden Absatz mitgeteilte Erwägung ließ es weiter notwendig erscheinen, die Einwirkung von Säuren auf Emulsin genauer zu untersuchen, als es bisher geschehen war. Die Untersuchung ergab folgendes: Durch Säuren werden

[1]) Diese Zeitschr. 10, 283, 1908.

beide Enzyme rasch unwirksam. Auch Essigsäure schadet. Zur Gewinnung möglichst wirksamer Emulsinpräparate ist deshalb der Zusatz von Essigsäure, wie er in manchen Vorschriften sich findet, besser zu unterlassen. Wenn kleine Mengen von Säuren, wie z. B. in dem Versuch der zweiten Mitteilung S. 260 verhältnismäßig wenig schaden, so ist dies hauptsächlich auf die Schutzwirkung zurückzuführen, welche die in Begleitung der Enzyme vorkommenden Eiweißstoffe betätigen (vgl. darüber die folgende Mitteilung). Wichtig ist, daß, wenigstens in den von mir untersuchten Emulsinpräparaten, die Geschwindigkeit, mit der das δ-Emulsin durch Säure inaktiviert wird, größer ist als die Inaktivierungsgeschwindigkeit des σ-Emulsins. Dadurch wurde es ermöglicht, durch geeignete Behandlung mit Säure das δ-Emulsin zu inaktivieren, während noch ein erheblicher Teil des σ-Emulsins unverändert blieb.

Läßt man auf eine Lösung von 1 g Schuchardtschem Emulsin in 20 g Wasser 40 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure 5 Minuten einwirken und neutralisiert nach dieser Zeit mit 40 ccm $^n/_{10}$-Kalilauge, dann zersetzt die Hälfte der so erhaltenen Flüssigkeit innerhalb $2^1/_2$ Stunden kein Amygdalin, während mit Benzaldehyd und Blausäure noch ein aktives Nitril erzielt wird. Die daraus durch Verseifung mit rauchender Salzsäure erhaltene Mandelsäure drehte 5,16° nach links. Da dieselbe Emulsinmenge ohne die Behandlung mit Säure eine Mandelsäure mit der Drehung 14,12° lieferte, so erhellt daraus, daß durch die geschilderte Behandlung mit Säure immerhin etwa zwei Drittel des σ-Emulsins zerstört werden. Die Inaktivierung des δ-Emulsins erfolgt aber durch dieselbe Behandlungsweise vollständig oder wenigstens bis auf minimale Spuren. Denn selbst nach 18stündiger Einwirkung von 50 g der obigen Flüssigkeit auf 2 g Amygdalin (bei 25°) war nur so viel Blausäure entstanden, daß eben Spuren von Berlinerblau nachzuweisen waren.

Will man nach der oben beschriebenen Weise das σ-Emulsin in festem Zustande gewinnen, so nimmt man statt der $^n/_{10}$-Flüssigkeiten die entsprechenden Mengen Normalflüssigkeiten und fällt mit Weingeist.

Neutralisiert man bereits nach 4 Minuten, so erhält man ein an σ-Emulsin reicheres Präparat, das auch noch als prak-

tisch frei von δ-Emulsin betrachtet werden kann. Längere Einwirkung der Säure zerstört allmählich auch das σ-Emulsin. Neutralisierte man erst nach 15 Minuten, so betrug die Drehung der erhaltenen Mandelsäure nur noch 0,55°. Die durch Säurezusatz bewirkte Änderung[1]) in dem Zustande der beiden Enzyme ist, wie diese Versuche zeigen, eine irreversible. Der ursprüngliche Zustand kann auch dadurch nicht wieder hergestellt werden, daß man nach der Neutralisation mit Alkali einen Überschuß von letzterem zugibt und ihn nach 5 Minuten wieder mit Säure beseitigt.

Der naheliegende Gedanke, daß es durch Einwirkung von Alkali möglich sei, auf analoge Weise das δ-Emulsin zu gewinnen, hat sich nicht verwirklichen lassen.

Ausdrücklich sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß die oben gegebene Vorschrift zur Gewinnung eines vom δ-Anteil freien σ-Emulsins nicht in solcher Weise allgemein sein will, daß ihre genaue Befolgung bei allen Emulsinpräparaten die bestmögliche Ausbeute sichert. Diese wird sowohl von dem Gehalte an σ- und δ-Emulsin, als auch von der Menge der vorhandenen schützenden Eiweißstoffe abhängen. Will man in Befolgung des oben beschriebenen Verfahrens σ-Emulsin herstellen, so muß man, wie ich es auch tun mußte, erst die Säuremenge und ganz besonders die Zeit ausprobieren, die eben hinreicht, um das vorhandene δ-Emulsin zu zerstören.[2]) Immerhin werden die oben angegebenen Daten geeignet sein, einen ersten Anhaltspunkt zu liefern. Vielleicht ist es auch nicht völlig ausgeschlossen, daß in einem an σ-Emulsin besonders armen Präparat dieses zuerst durch die Säure zerstört wird.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Gewinnung des σ-Emulsins kann der letzte Zweifel an der Existenz des σ- und

[1]) Durch den Zusatz der Säure tritt in der Emulsinlösung eine Fällung ein, die durch den nachfolgenden Zusatz von Alkali nicht wieder vollständig gelöst wird.

[2]) Zur Entscheidung darüber, ob die letzten Spuren δ-Emulsin zersetzt sind, wende man nach der Einwirkung auf Amygdalin die Berlinerblau- und nicht die Rhodanreaktion an, weil Emulsinpräparate selbst eine schwache, der Rhodanreaktion ähnliche oder mit ihr identische Erscheinung zeigen. Wodurch diese verursacht wird, mag gelegentlich näher untersucht werden. Es erscheint nicht völlig ausgeschlossen, daß ein Bestandteil des Emulsins eine Blausäureverbindung ist.

δ-Emulsins als beseitigt gelten. Damit ist auch (wohl zum erstenmal) in einem Falle mit aller Sicherheit nachgewiesen, daß die von einem und demselben Enzympräparat ausgeübten entgegengesetzten Wirkungen durch zwei voneinander verschiedene, wenn vielleicht auch nahe verwandte Körper verursacht werden. Die beiden Wirkungen, um die es sich hier zunächst handelt, sind der Auf- und Abbau des d-Benzaldehydcyanhydrins. (Vgl. dazu die zweitfolgende Mitteilung.) Da das δ-Emulsin außerdem imstande ist, die Zuckerkomplexe des Amygdalins abzuspalten, so ist es nicht ausgeschlossen, daß das σ-Emulsin die Fähigkeit besitzt, eine Anlagerung von Glucose an d-Benzaldehydcyanhydrin herbeizuführen. Versuche hierüber sind im Gange.

Meine auf die Isolierung des σ- und δ-Emulsins gerichteten Bemühungen sind hiermit zu einem gewissen Abschluß gelangt. Es seien deshalb im folgenden kurz die bisher ermittelten Eigenschaften der beiden Substanzen zusammengestellt, vermöge deren sie sich isolieren lassen.

1. Durch längeres Erhitzen auf Temperaturen von 40 bis 45° wird das δ-Emulsin zuerst inaktiviert; ein Teil des σ-Emulsins bleibt erhalten.

2. Durch geeignete Behandlung mit Säuren und nachfolgende Neutralisation mit Alkali wird ebenfalls das δ-Emulsin unter Erhaltung eines Teiles des σ-Emulsins inaktiviert.

3. Die bei Fällungen mit Kupfersulfat, bei Ganzsättigung mit Magnesiumsulfat, bei Halbsättigung mit Ammoniumsulfat zu erhaltenden Filtrate enthalten nur δ-Emulsin.

Zur Spaltung racemischer Cyanhydrine durch Emulsin.

Von

L. Rosenthaler.

(Mitteilung aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 12. April 1910.)

In meiner ersten Mitteilung[1]) über durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen wurde über die Tatsache berichtet, daß die optische Aktivität eines Gemisches von d- und r-Benzaldehydcyanhydrin, das man durch Einwirkung von Emulsin auf Blausäure und Benzaldehyd erhält, allmählich unter dem Einfluß des Emulsins zurückgeht, und später wurde gezeigt,[2]) daß man diese Abnahme durch einen Zerfall des d-Benzaldehydcyanhydrins in seine Komponenten zu erklären hat. Man konnte daraus den Schluß ziehen, es müsse möglich sein, zum l-Benzaldehydcyanhydrin zu gelangen, wenn man das r-Nitril mit Emulsin behandle und daß man ganz allgemein auf diesem Wege die optischen Antipoden derjenigen Körper erhalten müsse, die man durch die unter dem Einfluß des Emulsins sich vollziehende Synthese gewinnen kann. Herrn K. Feist[3]) ist es in der Tat gelungen, diese Spaltung durchzuführen, indem er den Kunstgriff gebrauchte, einen Luftstrom durch das Gemisch zu leiten. Ich habe schon früher darauf hingewiesen, daß der Zerfall des d-Benzaldehydcyanhydrins eine spezifische Wirkung des δ-Emulsins ist. Es wurde dies jetzt von neuem dadurch bewiesen, daß r-Benzaldehydcyanhydrin nach der Feistschen Methode mit der nur δ-Emulsin enthaltenden

[1]) Diese Zeitschr. 14, 246, 1908.

[2]) Diese Zeitschr. 17, 261, 1909.

[3]) Arch. d. Pharmazie 247, 226, 1909 und 248, 101, 1910.

Flüssigkeit behandelt wurde, die man erhält, wenn man eine Emulsinlösung halb mit Ammonsulfat sättigt. Es entstand so l-Benzaldehydcyanhydrin, das in d-Mandelsäure übergeführt werden konnte.

Allgemein wird sich die Darstellung optisch-aktiver Körper durch Spaltung der r-Nitrile mit Emulsin dann am günstigsten gestalten, wenn man beide Spaltungsprodukte entfernt. Eine merkliche Aufspaltung muß aber auch schon auftreten, wenn eines der beiden Spaltungsprodukte beseitigt wird, z. B. wenn man, wie ein von mir ausgeführter Versuch zeigt, ohne Luft durchzuleiten, Nickelformiat hinzusetzt und dadurch die frei werdende Blausäure bindet; doch wird dann durch die frei werdende Säure das Enzym geschädigt, und die Aufspaltung ist keine sehr erhebliche. Eine weitere Behandlung dieses Gegenstandes liegt nicht in meiner Absicht.

Eiweiß als Schutzmittel für Enzyme.

Von

L. Rosenthaler.

(Mitteilung aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 12. April 1910.)

Die üblichen Methoden zur Darstellung von Enzymen liefern zunächst ein Gemenge von Enzymen und Eiweißstoffen. Dieser Umstand ist es bekanntlich, der die Reindarstellung der Enzyme so sehr erschwert und in vielen Fällen es verhindert zu entscheiden, ob die Enzyme selbst den Charakter von Eiweißstoffen besitzen. Die Eiweißstoffe werden deshalb in der Regel als unerwünschte Begleitstoffe der Enzyme angesehen. Demgegenüber schien es mir von Interesse, die Frage zu prüfen, ob nicht das gemeinsame Vorkommen von Enzymen und Eiweißstoffen eine biochemische Bedeutung besitze. Diese konnte nur darin gesucht werden, daß den Eiweißstoffen die Funktion zukomme, die Enzyme gegen die schädigende Wirkung bestimmter Agenzien zu schützen. Erwägt man, welche Agenzien in dieser Hinsicht im pflanzlichen und tierischen Organismus in Betracht kommen, so ist in erster Linie an H- und OH-Ionen zu denken. Daneben wäre für das Pflanzenreich vielleicht noch an andere Stoffe zu denken, wie z. B. Gerbsäure oder Formaldehyd. Erstere wird aber sehr häufig in besonderen idioblastischen Elementen untergebracht, und der Formaldehyd tritt, wenn er überhaupt als regelmäßiger Pflanzenbestandteil auch nur vorübergehend vorkommt, doch sicher nur in minimaler Menge auf. Ich habe mich deshalb damit begnügt, das Verhalten einiger Enzyme gegen Säuren und Alkalien mit und ohne Anwesenheit von Eiweiß zu prüfen. Da Eiweiß amphoteren Charakter besitzt, so war von vorn-

herein zu erwarten, daß es sowohl gegen Säure als Alkali schützen würde. Die Versuche haben diese Annahme in vollem Maße bestätigt. Eine zum Teil weitgehende Schutzwirkung wurde in allen untersuchten Fällen, d. h. bei σ- und δ-Emulsin, bei Diastase und Invertin festgestellt. Dabei ist zu bedenken, daß die angewandten Mengenverhältnisse der reagierenden Substanzen völlig willkürlich gewählt sind; es ist deshalb sehr wohl möglich, daß der Schutz, den die Eiweißstoffe den Enzymen im Organismus selbst verleihen, ein noch weitergehender ist.

Wenn es somit ein leichtes ist, nachzuweisen, daß Eiweiß außerhalb des Organismus die Enzyme gegen H- und OH-Ionen zu schützen vermag, so wäre daraus noch nicht auf eine analoge biochemische Bedeutung zu schließen, wenn es nicht sicher wäre, daß die Enzyme auch im Organismus von Eiweißstoffen begleitet sind. Daran ist aber weder für den pflanzlichen noch für den tierischen Organismus zu zweifeln. Für das Pflanzenreich läßt sich insbesondere zeigen, daß diejenigen Zellen, die man als Enzymzellen anspricht, besonders reich an Eiweißstoffen sind. Die Reaktionen, die man zum Nachweis derartiger Zellen verwendet hat, sind deshalb in der Regel nichts anderes als Eiweiß-Reaktionen. So sind die Zellen der Cruciferen-Samen, die Heinricher wegen ihrer starken Millonschen Reaktion als Eiweißschläuche beschrieben hatte, nach Guignard mit den Myrosinzellen identisch.[1]) Auch die Emulsinzellen der Mandeln wies Guignard mit Hilfe der Millonschen Reaktion nach.[2]) Die Kleberschicht der Gramineen-Samen, die nach Haberlandt[3]) zu den Verdauungsdrüsen gehört und während der Keimung Diastase sezerniert, ist reich an Eiweißstoffen. Die Vanillin-Salzsäure-Reaktion endlich, die M. Winckel als Reagens auf Enzyme und Enzymzellen heranzog,[4]) ist, wie ich früher gezeigt habe,[5]) nichts anderes als eine Reaktion auf Eiweiß (und Tryptophan). Die aus allen diesen Angaben mit Sicherheit hervorgehende Tatsache, daß

[1]) Vgl. F. Czapek, Biochemie der Pflanzen 2, 233.
[2]) Ebenda, S. 255.
[3]) Physiologische Pflanzenanatomie, 3. Aufl., S. 444.
[4]) Apotheker-Zeitung 1905, 209.
[5]) Ebenda, 1907, 678.

Eiweiß in den Enzymzellen in außergewöhnlich hohem Maße angehäuft ist, rechtfertigt den oben aus den experimentellen Ergebnissen gezogenen Schluß auf die biochemische Bedeutung der Eiweißstoffe. Diese sind mindestens imstande, die Enzyme eine Zeitlang gegen die schädigenden Wirkungen von H- und OH-Ionen zu schützen.

Experimentelles.

I. δ-Emulsin.

Zu den Versuchen wurden je 0,5 g Mercksches Emulsin und die jeweils angegebenen Amygdalinmengen verwendet, außerdem bei den Versuchen mit Eiweiß je 1 g Eieralbumin. Die Gesamtflüssigkeit betrug immer 150 ccm. Hatte das Emulsin $2^1/_2$ Stunden bei 25° eingewirkt, so wurde es durch Zusatz von 10 ccm $^n/_1$-Kalilauge abgetötet und diese dann nach 10 Minuten durch 10 ccm $^n/_1$-Schwefelsäure neutralisiert. Die darauf abdestillierte Blausäure wurde mit $^n/_{10}$-Silbernitrat nach Dénigès titriert.

a) Blinder Versuch mit 8 g Amygdalin: 65,8 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

b) 10 ccm Emulsinlösung mit 20 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 versetzt, nach 2 Minuten Neutralisation mit ebensoviel $^n/_{10}$-KOH: Das Amygdalin (8 g) wird nicht zersetzt.

c) Wie b, aber Zusatz von 1 g Eiweiß vor dem der Säure: 34 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

d) Zum Emulsin zuerst 20 ccm $^n/_{10}$-KOH, nach 10 Minuten ebensoviel $^n/_{10}$-H_2SO_4, dann 2 g Amygdalin: 1,3 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

e) Wie d, aber mit vorherigem Zusatz von Eiweiß: 7 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

II. σ-Emulsin.

Die Versuche wurden mit 5,3 g Benzaldehyd, 0,54 g Blausäure und 0,5 g Emulsin genau so ausgeführt, wie früher[1]) geschildert. Da bei einem Teil der Versuche nur geringe Drehungen zu erwarten waren (das Mercksche Emulsin ist arm an σ-Emulsin), so wurde das erhaltene d-Benzaldehydcyanhydrin jeweils in die beträchtlich stärker drehende l-Mandelsäure übergeführt. Zu diesem Zwecke wurde, um immer gleichmäßige Verhältnisse zu haben, die Chloroformlösung des Nitrils

[1]) Diese Zeitschr. 17, 258, 1909.

mit 50 g rauchender Salzsäure versetzt. Nach 1stündiger Einwirkung wurde abdestilliert und zur Trockne verdampft. Die jeweils angegebene Drehung bedeutet die Gesamtdrehung der auf diese Weise erhaltenen, mit Wasser aufgenommenen Mandelsäure.

a) Blinder Versuch $\alpha = -4{,}28$.

b) Zu der Lösung von 0,5 g Emulsin in 10 ccm Wasser erst 20 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4, nach 2 Minuten ebensoviel $^n/_{10}$-KOH: $\alpha = -1{,}57$.

c) Dasselbe, aber vor dem Zusatz der Säure Zusatz von 1 g Eiweiß: $\alpha = -4{,}26$.

d) Zu der Emulsinlösung erst 20 ccm $^n/_{10}$-KOH, dann nach 10 Minuten Neutralisation: $\alpha = -0{,}8$.

e) Wie d, aber mit vorherigem Zusatz von 1 g Eiweiß: $\alpha = -5{,}62$. Die Drehung ist hier auffallenderweise größer als im Versuche a. Doch ist die angewandte Methode nicht genau genug, als daß sich daraus besondere Schlüsse ziehen ließen.

III. Diastase.

Angewandt: 2 g Weizenstärke mit so viel Wasser verkleistert, daß die Gesamtflüssigkeit 110 ccm betrug und 0,1 g Wittesche Diastase. Nach 1stündiger Einwirkung bei 25° wurde in 20 ccm der Flüssigkeit der entstandene Zucker nach Allihn bestimmt. Das Kupferoxydul wurde zur Wägung in Kupferoxyd übergeführt.

a) Blinder Versuch. 2 g Stärke und 0,1 g Diastase zu 110 ccm: 0,2237 g CuO.

b) Die Lösung von 0,1 ccm Diastase in 10 ccm Wasser wird mit 10 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 versetzt; Neutralisation nach 10 Minuten. Es werden nur Spuren von Kupferoxydul gebildet.

c) Dasselbe, mit Zusatz von 1 g Eiweiß vor dem Zusatz der Säure: 0,1558 g CuO.

d) Wie b, doch erst Alkali und dann Säure: Auch hier werden nur Spuren von Kupferoxydul gebildet.

e) Wie d, doch mit Eiweiß: 0,0875 g CuO.

IV. Invertin.

Angewandt: Ein mit 10 Teilen Thymolwasser hergestellter Auszug des nach Bourquelots[1]) Angabe bereiteten Invertins.

[1]) Arch. d. Pharmazie 245, 166, 1907.

Davon je 5 ccm; ferner je 10 ccm einer 5%igen Lösung von Rohrzucker und 5 ccm 10%ige Eiweißlösung. Versuchsdauer: 24 Stunden bei 25°. Nach dieser Zeit wurden die Flüssigkeiten durch Zugabe von 15 g Bleiacetat und 10 ccm der Mercurinitratlösung von Patéin und Dufau[1]) geklärt und die Drehung der filtrierten Flüssigkeit im 200 mm-Rohr gemessen. Die angegebenen Werte bedeuten diese Drehung.

Die ersten Versuche zeigten, daß Invertin wesentlich widerstandsfähiger gegen Säuren und Alkalien ist als die anderen benutzten Enzyme. Es mußten deshalb erheblich größere Konzentrationen von Säure und Lauge zur Anwendung gelangen. Die Einwirkungsdauer der Säure mußte außerdem auf 1 Stunde erhöht werden. Selbst dann waren die zu beobachtenden Unterschiede keine allzu großen.

a) Blinder Versuch: 10 ccm Zucker, 5 ccm Eiweiß, 30 ccm Wasser: $\alpha = +1{,}16$.

b) Zu 5 ccm Invertin + 5 ccm Wasser 10 ccm $^n/_1$-H_2SO_4, nach 1 Stunde 10 ccm $^n/_1$-KOH, dann 10 ccm Zucker und nach 24 Stunden 5 ccm Eiweiß: $\alpha = +1{,}16$.

c) Zu 5 ccm Invertin + 5 ccm Eiweiß 10 ccm $^n/_1$-H_2SO_4, nach 1 Stunde 10 ccm $^n/_1$-KOH, dann 10 ccm Zucker und nach 24 Stunden 5 ccm Wasser: $\alpha = +0{,}21$.

d) Blinder Versuch: 10 ccm Zucker, 15 ccm Wasser, 5 ccm Eiweiß: $\alpha = +1{,}56$.

e) 5 ccm Eiweiß, 10 ccm Zucker, 10 ccm Wasser, 5 ccm Invertin: $\alpha = -0{,}58$.

f) 5 ccm Invertin + 15 ccm Wasser, dazu 2,5 ccm $^n/_1$-KOH, dann nach 10 Minuten 2,2 ccm $^n/_1$-H_2SO_4, zuletzt 5 ccm Eiweiß und 10 ccm Zucker: $\alpha = +1{,}34$.

g) 5 ccm Invertin + 5 ccm Eiweiß, dazu 2,5 ccm $^n/_1$-KOH; nach 10 Minuten Neutralisation mit 2,5 ccm $^n/_1$-H_2SO_4, dann 5 ccm Wasser und 10 ccm Rohrzucker: $\alpha = -0{,}34$.

[1]) Vgl. E. Spaeth, Untersuchung des Harnes, 2. Aufl., S. 224.

Der Grundumsatz und Nahrungsbedarf des Säuglings gemäß Untersuchungen des Gasstoffwechsels.

Von

Arthur Schloßmann und Hans Murschhauser.

(Aus der Klinik für Kinderheilkunde in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 8. April 1910.)

Mit 6 Figuren im Text.

Will man systematisch den Stoff- und Kraftwechsel des Säuglings klarlegen, so ist die Kenntnis des Grundumsatzes in dieser Lebensepoche die unerläßliche Voraussetzung. War nun die Forderung von vornherein naheliegend, diese Frage nach dem Grundumsatz beim Säugling experimentell in Angriff zu nehmen, so wollte uns doch die Hoffnung nur gering erscheinen, einer Lösung dieser wichtigen physiologischen Aufgabe nahe zu kommen. Denn soll der Gaswechsel, der dem Grundumsatz entspricht, ermittelt werden, so muß der Organismus des Versuchsobjektes in einem völligen Ruhezustand gehalten werden. Es muß somit alles an Leistungen ausgeschaltet werden, was sich eben ausschalten läßt: einerseits also die Muskeltätigkeit, soweit sie nicht für vitale Funktionen unbedingt nötig ist (Herztätigkeit, Atmung usw.), andererseits aber auch die Verdauungsarbeit. Praktisch ausgedrückt mußten wir also von unseren Versuchskindern verlangen, daß sie sich im Hungerzustande befinden und sich zugleich völlig ruhig verhalten. Daß gesunde und normale Säuglinge — denn

nur an solchen kann man physiologische Tatsachen erheben — sich stundenlang diesen beiden, dem Charakter des Kindes anscheinend widersprechenden Anforderungen fügen würden, erschien uns zunächst recht unwahrscheinlich, und bei der Aufstellung unseres Versuchsprogrammes hatten wir vorerst der Hoffnung gar nicht Raum gegeben, den Grundumsatz des Säuglings experimentell ermitteln zu können. Aber auch hier sollte sich zeigen, daß man vollkommen voraussetzungslos derartige Probleme in Angriff nehmen muß.

Es verhalten sich nämlich, wie wir bald erkennen konnten, die Säuglinge bei Respirationsversuchen durchaus nicht gleichartig. Das Temperament gehört offenbar zu den angeborenen Eigenschaften des Menschen; und wie diese sich im späteren Leben Mißlichkeiten, Unbequemlichkeiten oder neuen und ungewohnten Situationen gegenüber sehr verschieden verhalten, so wirkt das Verbringen in den Respirationsapparat auf den einen Säugling ganz anders als auf den anderen. Wir hatten beim Beginn unserer Versuche mit dem Regnault-Reisetschen Apparate überhaupt das Glück, zufällig auf ein musterhaftes Versuchskind zu treffen (Fritz Suttholt, siehe diese Zeitschr. 14, 385 ff. und 18, 499). Wir haben uns seitdem oft genug überzeugen können, daß es nicht immer so leicht ist, gefügige Kinder zu finden und wir sind dem Zufalle besonders dankbar, daß die vielen Schwierigkeiten beim Beginne der Versuche nicht durch widerspenstiges Benehmen des ersten Versuchskindes gemehrt worden sind. Seitdem haben wir mit mehreren Dutzenden von Kindern gearbeitet und dadurch eine gewisse Erfahrung in der Auswahl passender Objekte gewonnen. Schon beim ersten Versuch wissen wir jetzt zumeist, ob das betreffende Kind sich brauchbar für unsere Zwecke erweisen wird oder nicht. So haben wir jetzt in dem schon recht ansehnlichen experimentellen Material, über das wir verfügen, eine ganze Reihe von Versuchen, bei denen die Kinder zum Teil stundenlang hintereinander schlafend oder in annähernd absoluter Ruhe im Respirationsapparat beobachtet werden konnten. Der Ausschluß der Bewegung, der Muskelarbeit im gewöhnlichen Sinne gelingt also zweifellos und sogar recht leicht. Wir werden gerade im Verfolg unserer Darlegungen sehen, welchen eklatanten Unterschied es ausmacht, ob das Versuchskind völlig

ruhig liegt oder durch intensive Bewegungen, durch Saugen an den Fingern, Schütteln des Kopfes oder gar durch Schreien die Stoffzersetzung vermehrt.

Im allgemeinen wird nun die Ruhe wesentlich dadurch erleichtert, daß man die Kinder unmittelbar nach einer reichlichen Mahlzeit in den Versuch nimmt und die Trägheit während der normalen Verdauungsarbeit als zur Ruhe führendes Moment mit ausnutzt.

Dagegen bedeutete es selbst für den erfahrenen Praktiker eine angenehme Überraschung, daß recht viele Säuglinge auch dem Hunger gegenüber eine sehr weit gehende Indifferenz zeigen. Anläßlich von therapeutischen Maßnahmen bei in bezug auf den Stoffwechsel kranken Säuglingen kann man beobachten, daß der eigentliche Hunger dann offenbar wenig oder auch gar nicht unangenehm empfunden wird, wenn nur die genügende Flüssigkeitsmenge in Gestalt von Wasser zugeführt wird. Aber auch gesunde Säuglinge remonstrieren kaum oder gar nicht, wenn man ihnen 24 Stunden die Nahrung entzieht, vorausgesetzt, daß man sie durch Verabreichung von Flüssigkeit über das, was eigentlich mit ihnen geschieht, hinwegtäuscht. Auch der Gewichtsabfall ist gar nicht so sehr bedeutend, und durch vermehrten Ansatz nach Wiederaufnahme genügender Ernährung wird das Defizit infolge des Hungertages rasch wieder ausgeglichen. Mit dieser uns gekommenen Erkenntnis von der Belanglosigkeit eines eingeschobenen Fasttages für das Wohlbefinden und, wie gesagt, auch das Wohlbehagen des Säuglings war die Möglichkeit gegeben, die Ermittelung des Grundumsatzes bei gesunden Kindern in Angriff zu nehmen.

Bei Erwachsenen hat man bei den entsprechenden Untersuchungen in der Regel 12 bis 18 Stunden nach der letzten Mahlzeit als den geeigneten Zeitpunkt für den Beginn des Versuchs betrachtet. Wir haben uns für den extremsten Termin entschieden und haben unsere Versuche immer 18 Stunden nach Aussetzen der Nahrung begonnen. Da beim Erwachsenen alsdann sicher der Einfluß der vorausgegangenen Mahlzeit ausgeschlossen ist, so dürfte das beim Säugling erst recht der Fall sein. Denn das Aufschließen der gemischten Kost bei ersterem erfordert jedenfalls mehr Zeit als der digestive Abbau der in Form von

reinen und schlackenfreien Nährstoffen gebotenen Säuglingsnahrung. Praktisch wurde also so verfahren, daß dem Kinde am Abend vor dem Versuch, etwa um 9 Uhr, das letztemal Nahrung in der sonst für das betreffende Individuum üblichen Menge und Art gereicht wurde. Am nächsten Tage bekam das Kind zu den Zeiten, zu denen sonst die Nahrung gereicht wurde, die entsprechende Menge ganz dünnen (kaum gefärbten) und mit Spuren Saccharin gesüßten Tees.

Viele Kinder trinken, nachdem sie vielleicht beim ersten Darreichen versagen, die Flasche mit dieser Pseudonahrung gemächlich aus, und häufig steht man unter dem Eindruck, daß sie des effektiven Hungerns gar nicht gewahr werden. Brustkinder müssen natürlich erst an die Flasche überhaupt gewöhnt werden; es wurde ihnen also eine Reihe von Tagen vorher die abgezogene Milch ihrer Mütter aus der Flasche verabreicht. Erst wenn sie sich hieran völlig akklimatisiert hatten, wurde die Frauenmilch durch die Hungerdiät ersetzt. 18 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme, also in der Regel nachmittags um 3 Uhr, wurde der Versuch begonnen und zumeist 3 Stunden lang durchgeführt. Es wäre uns natürlich lieb gewesen, eine Anzahl von 8stündigen Versuchen zu machen, um Vergleichswerte mit unseren früheren Feststellungen an anderen Kindern zu gewinnen. Es zeigte sich aber, daß die Ruhe sich doch nicht so lange in genügender Weise durchhalten läßt. Wir sind aber in der Lage, auch nur 3stündige Versuche mit großer Genauigkeit zu berechnen, da wir uns dabei eines sehr kleinen Gefäßes für den O bedienen; infolgedessen können die Wägungen des verbrauchten O mit größerer Genauigkeit vorgenommen werden als bei der Verwendung des großen Gasometers. Im übrigen ergaben Vergleiche zwischen länger ausgedehnten Versuchen und solchen, die nur 3 Stunden währten, keinerlei Unterschied. Aus praktischen Gründen entschlossen wir uns daher, die Hungerversuche auf 3stündige Dauer zu beschränken.

Äußerst wichtig war es natürlich, eine zuverlässige Beurteilung darüber zu ermöglichen, ob das Versuchskind sich wirklich völlig ruhig verhalten hat oder nicht. Sobald also das Kind im Apparate lag und der Versuch begann, wurde fortgesetzt genau aufgezeichnet, wie es sich verhielt. Auf Millimeterpapier wurde jede Bewegung, jedes Saugen, jedes Kopf-

schütteln, kurz und gut alles, was das Kind tat, möglichst genau notiert. Versuche, bei denen eine irgendwie hochgradige Unruhe verzeichnet war oder bei denen das Kind gar schrie, wurden für die Beurteilung der in Rede stehenden Frage gänzlich ausgeschaltet. Eine absolute Ruhe gibt es natürlich beim Säugling nicht. Auch ideale Versuchskinder, z. B. Lübbert, siehe Fig. 1 und 2, machen gelegentlich im Schlafe einmal eine Bewegung, drehen sich etwas oder bewegen einmal den Arm. Immerhin zeigen die Kurven, wie ruhig sich solche hungernde Kinder verhalten können. Allerdings wird selbst bei völliger Ruhe das eine Kind einmal etwas mehr CO_2 produzieren als das andere, da ja auch psychische Momente mitsprechen, durch die die Atmungstätigkeit beeinflußt wird. So glauben wir beobachtet zu haben, daß ein und dasselbe Kind bei dem ersten Versuche in der Regel etwas höhere Werte gibt als bei Wiederholung und nach erfolgter Angewöhnung an die Versuchsbedingungen.

Wenden wir uns jetzt zur Besprechung des Grundumsatzes des gesunden Säuglings, so legen wir dem in erster Linie 6 Versuche unter, die wir an 3 Kindern erhoben haben. Es handelt sich dabei um zwei unnatürlich und einen natürlich genährten Säugling.

Das 1. Kind, Elfriede Simons, war am 23. März 1909 geboren und am 17. Juli wegen akuter Ernährungsstörung aufgenommen. Die Heilung erfolgte rasch bei Frauenmilch. Nach Abstillen wurden die Versuche am 14. und 20. September vorgenommen. Das Gewicht des Kindes war 5010 bzw. 5115 g bei einem Alter von 174 bzw. 180 Tagen. Wir hatten es hier mit einem kleinen und fettarmen, aber nicht schwächlichen Kinde zu tun (siehe Prot. 1 und 2 auf S. 32ff.).

Das 2. Kind, Johanna Passipen, war am 21. April 1909 geboren, am 8. Juli 1909 aufgenommen wegen einer schweren akuten Ernährungsstörung, deren Reparation langsam von statten ging. Als das Kind wieder völlig hergestellt und etwa 14 Tage abgestillt war, wurde mit den Versuchen begonnen. Das Kind war klein, sehr fettarm, machte aber keinen eigentlich schwächlichen Eindruck; es war 149 bzw. 169 Tage alt, während 2 Versuchen, über die wir zunächst berichten; es wog 4220 bzw.

4430 g, also beträchtlich weniger als dem Alter entsprochen hätte (siehe Prot. 3 und 4 auf S. 34ff.).

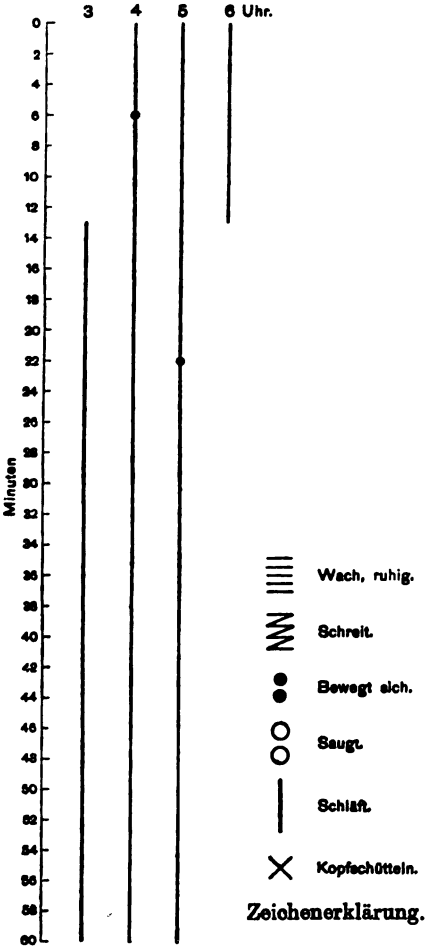


Fig 1.
Lübbert 9. II.

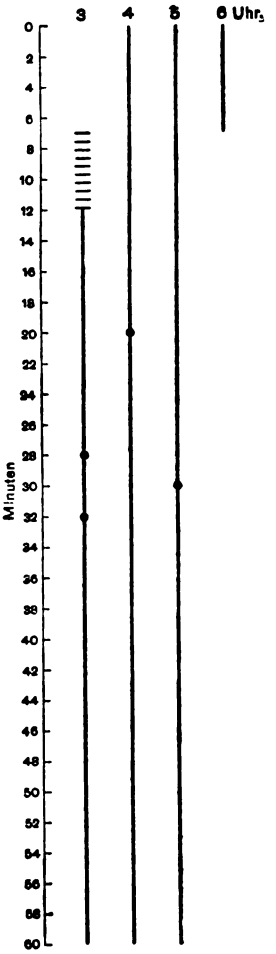


Fig. 2.
Lübbert 15. II.

Das 3. Kind, Elfriede Lübbert, geboren am 14. Nov. 1909, war ein kleines, aber auffallend fettes Kind, das immer von seiner Mutter genährt worden war. Beim ersten Versuch war es 87 Tage und wog 4980 g, beim zweiten Versuch 93 Tage und wog 5040 g (siehe Prot. 5 und 6 auf S. 36).

Die Versuche ergaben:

Tabelle I.

Hungerversuche bei annähernd absoluter Ruhe.

Laufende Nr.	Name	Geschlecht	Alter in Tagen	Gewicht g	Oberfläche qm	Kohlensäure pro Std. u. kg	Sauerstoff pro Std. u. kg	Kohlensäure pro Std. u. qm	Sauerstoff pro Std. u. qm	Respirator. Quotient
1	Simons	Mädchen	174	5010	0,3505	0,438 l = 0,8582 g	0,516 l = 0,7374 g	6,262 l = 12,27 g	7,390 l = 10,56 g	0,847
2	„	„	180	5115	0,3553	0,433 l = 0,8484 g	0,525 l = 0,7502 g	6,236 l = 12,22 g	7,565 l = 10,81 g	0,824
3	Passipen	„	149	4220	0,3124	0,466 l = 0,9131 g	0,544 l = 0,7774 g	6,303 l = 12,35 g	7,362 l = 10,52 g	0,856
4	„	„	169	4430	0,3228	0,469 l = 0,9190 g	0,564 l = 0,8060 g	6,451 l = 12,64 g	7,754 l = 11,08 g	0,832
5	Lübbert	„	87	4980	0,3491	0,441 l = 0,8641 g	0,599 l = 0,8560 g	6,293 l = 12,33 g	8,551 l = 12,22 g	0,73
6	„	„	93	5040	0,3519	0,409 l = 0,8014 g	0,534 l = 0,7631 g	6,859 l = 11,48 g	7,649 l = 10,93 g	0,76

Von vornherein ist zu bemerken, daß es erwünscht gewesen wäre, Kinder in den Versuch zu nehmen, die sich dem ihrem Alter entsprechenden Durchschnittsgewicht mehr genähert hätten. Das einzige Kind, das wenigstens annähernd dieser Forderung gerecht war, ist Lübbert, das klein und etwas zu früh geboren war, aber doch ganz regelmäßig vorangegangen war und durchaus den Eindruck eines normalen Brustkindes machte. Bei solchen Versuchen muß man eben die Feste feiern, wie sie fallen; und auf der anderen Seite bietet unser Material sehr gute Vergleichsmöglichkeiten. Das Brustkind Lübbert nämlich entspricht in seinem Gewichte im Alter von ca. 3 Monaten dem Gewichte von Simons im Alter von 6 Monaten. Und Passipen steht wiederum im Alter Simons sehr nahe und bleibt doch im Gewichte wesentlich zurück. Betrachten wir nun unsere Tabelle I von diesem Gesichtspunkte aus, so springt sofort ins Auge, daß in der Ruhe und beim Hunger das Alter des Kindes keinerlei Bedeutung hat, sobald man die Oberfläche des Kindes in Berücksichtigung zieht. Wir sehen auch hier wieder: unabhängig vom Alter, einzig allein abhängig von der Oberfläche geht CO_2-Produktion und O-Verbrauch einher. Die Zahlen untereinander nähern sich bei den einzelnen Ver-

suchen desselben Kindes außerordentlich, mit Ausnahme des Versuchs 6, der sich von 5 wesentlich unterscheidet.

Wir haben deshalb den Versuch mit diesem Kinde 2 Tage später nochmals wiederholt (am 17. Februar) und dabei Werte erhalten, die den im ersten Versuch ermittelten sehr nahe stehen, nämlich:

Gesamt-CO_2-Produktion 6,229 l = 12,205 g,
Gesamt-O-Verbrauch 7,812 l = 11,1685 g,
CO_2-Produktion pro Kilogramm und Stunde = 0,427 l,
O-Verbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,536 l,
CO_2-Produktion pro Stunde und Quadratmeter = 11,85 g,
O-Verbrauch pro Stunde und Quadratmeter = 10,85 g.

Der etwas auffällig hohe O-Verbrauch in Versuch 5 ist offenbar auf die Tatsache zurückzuführen, daß vorwiegend Fett verbraucht worden ist. Gerade das Kind Lübbert machte einen auffallend fetten Eindruck im Verhältnis zu den mageren Kindern Passipen und Simons. Es ist also durchaus denkbar, daß hier der Hungerstoffwechsel so gut wie ausschließlich auf Kosten des Fettes gegangen ist, eine Annahme, die ihre Analoga bei anderen Stoffwechselversuchen findet. „Ein höherer Grad von Fettarmut beeinflußt selbst die Eiweißzersetzung im Hunger im merklichsten Maße", sagt Rubner.[1]) So kann man annehmen, daß die zirkulierenden Reservestoffe, die dem Brustkinde und zumal dem fettreichen, zur Verfügung stehen, neben Eiweiß Fett und Fettsäureverbindungen enthalten oder aber, daß das fettreiche Individuum zunächst von dem in Überfluß vorhandenen Fett seinen Bedarf deckte, bevor es den Glykogenbestand des Körpers in Angriff nahm. Daher ein respiratorischer Quotient von 0,73. Als wenige Tage darauf der Hungerversuch wiederholt wurde, war nicht mehr ausschließlich Fett disponibel, und der respiratorische Quotient steigt daher auf 0,76 und 2 Tage später, als das Kind wieder 18 Stunden gehungert hatte, sogar auf 0,79. Aus diesen Erwägungen heraus kann man vielleicht die Erklärung für den hohen O-Wert bei Versuch 5 finden.

Bedenkt man ferner, daß ja doch schließlich die Individualität auch hier ihren zweifellosen Einfluß ausübt, so liegen die

[1]) Rubner und Heubner, Zeitschr. f. Biol. 38, 392.

von uns ermittelten Zahlen nahe genug aneinander, um die Gesetzmäßigkeit bei den Stoffwechselvorgängen in Hunger und Ruhe zu erkennen. Wir können also getrost eine Mittelzahl aus den von uns gefundenen Werten ziehen und diese als für den Grundumsatz des Säuglings charakteristisch betrachten.

Tabelle II.

Aus den 6 Versuchen in Tabelle I ergibt sich als Durchschnitt:

a.

bei jedem einzelnen der 3 Kinder:

	CO_2				O			
	pro kg u. St.		pro qm u. St.		pro kg u. St.		pro qm u. St.	
	l	g	l	g	l	g	l	g
1. Simons	0,436	= 0,8543	6,252	= 12,25	0,520	= 0,7431	7,481	= 10,69
2. Passipen	0,468	= 0,9170	6,374	= 12,49	0,554	= 0,7917	7,558	= 10,80
3. Lübbert	0,425	= 0,8328	6,078	= 11,91	0,567	= 0,8102	8,104	= 11,58

b.

Als Durchschnittswert aus allen 6 Versuchen an den 3 Kindern:

CO_2-Produktion pro St. u. qm.	O-Verbrauch pro St. u. qm.
6,236 l = 12,22 g	7,712 l = 11,02 g

Somit würde bei Ruhe und Hunger der Säugling pro Quadratmeter Oberfläche ca. 12 g CO_2 produzieren und ca. 11 g O konsumieren.

Vergleichen wir diesen Wert mit dem von Atwater[1]) für den Erwachsenen gefundenen, so sehen wir folgendes: Atwaters Versuchsperson J. C. W., ca. 22 Jahre alt, 76 kg schwer, produzierte pro Quadratmeter und Stunde im Durchschnitt 12,76 g CO_2. Diese Versuche waren aber nicht Ruheversuche im weitesten Sinne, insofern als gewisse Arbeit dabei geleistet wurde (siehe S. 515 bei Atwater). Während der Zeit von 7 Uhr abends bis 7 Uhr früh, die sich am ehesten mit unseren Versuchen vergleichen läßt, haben wir 11,84 g CO_2 pro Stunde und Quadratmeter. Also auch bei der Ermittelung des Grundumsatzes liegt kein essentieller Unterschied zwischen Säugling und Erwachsenen vor, sobald man die Oberflächeneinheit als Vergleichsmaß einsetzt.

Ganz wesentlich wird natürlich der Ausfall des respiratorischen Stoffwechselversuchs davon abhängen, welchen Grad

[1]) W. O. Atwater, Neue Versuche über Stoff- und Kraftwechsel im menschlichen Körper. Ergebnisse d. Physiol., 3. Jahrg., I. Abt., 1, 497 ff.

von Ruhe das Versuchsobjekt während des Versuchs gewahrt hat. Ja, Angaben in der Literatur, die dem Kinde auch für die Oberflächeneinheit einen regeren Stoffwechsel zusprechen als dem Erwachsenen, lassen die Vermutung naheliegend erscheinen, daß eine psychische Erregung, wie sie z. B. das Aufsetzen einer Maske bei Versuchen nach Geppert und Zuntz im Gefolge hat, erhöhte Atemzahl, vertiefte Atmung und damit höhere Werte für die CO_2 im Gefolge hat. Diese Momente fallen ja bei Benutzung von Säuglingen und dem Regnault-Reisetschen Apparate als Fehlerquellen fort. Die Gefahr, die wir bei unseren Versuchen zu vermeiden haben, ist eine eventuelle Muskelarbeit der Kinder; denn eine solche beeinflußt die Resultate ganz eklatant. Ja, wir sind sogar in der Lage, einen gewissen Anhaltspunkt dafür zu gewinnen, wie groß die Energie ist, die der Säugling bei seinen Bewegungen verwendet.

So haben wir das Kind Passipen einmal in einen längeren Hungerversuch genommen, bei dem die Beobachtungszeit auf $6^1/_2$ Stunden ausgedehnt wurde. (Siehe Protokoll 7 und Fig 4). Bei diesem Versuche benahm sich das Kind im ganzen 30 Minuten recht ungebärdig, wenn wir die einzelnen Bewegungsphasen denen in der großen Unruheperiode zwischen $4^h\,2'$ und $4^h\,31'$ zuzählen; ja, einen Teil dieser Zeit schrie das Kind. Aus den früheren Versuchen 3 und 4 auf Tabelle I wissen wir aber, wieviel CO_2 gerade dieses Kind pro Stunde produzierte, nämlich 0,916 g auf das Kilogramm.

In $6^1/_2$ Stunden hätten bei einem Gewichte von 4410 g also 26,257 g CO_2 produziert werden müssen. In der Tat sind es 27,9253 g, also 1,67 g mehr wie zu erwarten. Dieses Plus fällt aber auf die Mehrleistung in der unruhigen halben Stunde. Nach den früheren Versuchen war für 30 Minuten eine CO_2-Produktion von $\frac{0{,}916 \times 4{,}41 \text{ g}}{2}$ zu erwarten, also 2,02 g CO_2. Da für diese $^1/_2$ Stunde 1,67 g CO_2 für die Bewegungsarbeit hinzukommen, so betrug die CO_2-Produktion also unter diesem Einfluß 3,69 g, d. h. sie steigt von 100 auf 184, somit beinahe auf das Doppelte. Auf die Stunde und den Quadratmeter berechnet haben wir in diesem Versuche eine CO_2-Abgabe von 13,35 g und einen O-Verbrauch von 11,46 g für die ganzen $6^1/_2$ Stunden.

Die halbstündige Unruhe erhöht hier den respiratorischen Stoffwechsel scheinbar nicht sehr bedeutend, aber doch immerhin scharf erkennbar; es waren eben 1 Teil Unruhe und 6 Teile wirkliche Grundumsatzphasen in dem Versuche zu scheiden.

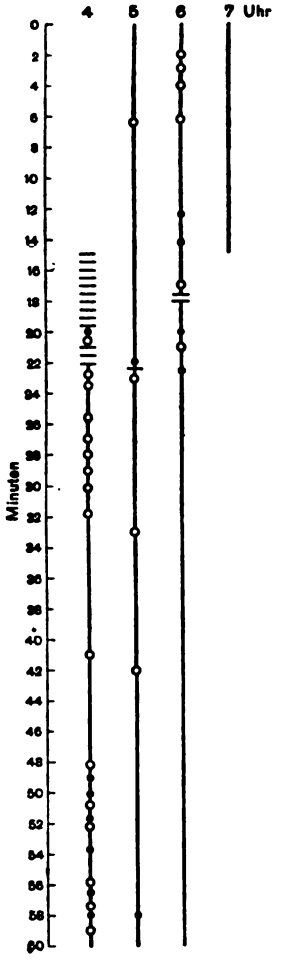


Fig. 3.
Passipen 16. IX.

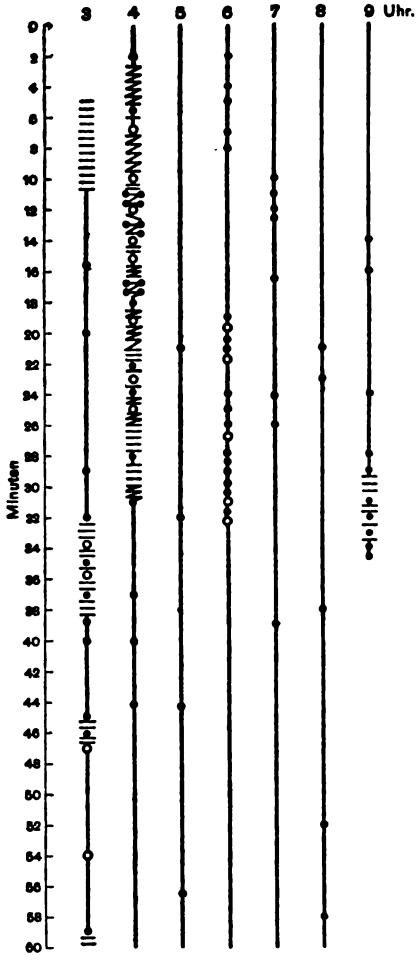


Fig. 4.
Passipen 18. X.

Die Tatsache, daß die motorische Unruhe und Schreien des Kindes Stoffwechselversuche ungünstig beeinflussen, ist allen denen, die Säuglinge in Zwangslagen bringen, um Kot und Urin genau und sicher aufzufangen, ganz geläufig. Hieran scheitern

ja so oft unsere Versuche, wirklich physiologische Werte zu erhalten. Auch Heubner[1]) hat sehr richtig die erhöhten CO_2-Werte, die er mit Rubner bei einem unnatürlich genährten Säugling gegenüber dem Brustkinde erhielt, auf Rechnung der erhöhten äußeren Arbeit zurückgeführt, die sich in einer hochgradigen Beweglichkeit des Kindes dokumentierte.

Die Steigerung der Wärmeproduktion betrug hier 21% auf die Dauer des mehrtägigen Versuches, doch war eben bei der Anordnung desselben eine gesonderte Betrachtung der Ruhemomente von denen mit Arbeit nicht möglich. Bei der Wichtigkeit der Frage, welche Arbeit des Säuglings eigentlich bei den üblichen Unruheerscheinungen leistet, ist es angebracht, noch andere Versuche, die uns darüber großen Aufschluß geben, ausführlicher darzulegen. Besonders gute Gelegenheit zu Beobachtungen nach dieser Richtung bot uns das Kind Wilhelmine Niesmann, das unseren Bestrebungen, durch einen wirklichen Ruheversuch den Grundumsatz festzustellen, recht energischen Widerstand entgegensetzte. Immerhin haben wir einen Versuch, bei dem zwar keine völlige Ruhe erzielt wurde, bei dem aber das Kind doch nicht allzuviele und nur sehr kleine Bewegungen machte. (Protokoll 8 und Fig 5). Das Kind war am 7. August 1909 geboren und der in Rede stehende Versuch fand am 21. Januar statt. Das Kind trank in der Regel an der Brust seiner Mutter, ging aber nur langsam voran. Es gehörte zu jener Klasse immer zappeliger Kinder, die einen besonderen Typus auch im Säuglingsalter repräsentieren. Es war bei dem Versuche vom 21. Januar 168 Tage alt und wog 5440 g. Es entsprach im Alter also gerade Passipen bei Versuch 4, war jedoch 1 kg schwerer.

Die Oberfläche berechnet sich auf 0,3699 qm. Es fanden sich:

CO_2	pro	Kilogramm	und Stunde	0,443 l,
O	„	„	„ „	0,537 l,
CO_2	„	Quadratmeter	„ „	12,91 g,
O	„	„	„ „	11,31 g,
Respir. Quotient				0,825.

Wir sehen, daß die Werte nur unwesentlich die von uns ermittelten Durchschnittszahlen überschreiten entsprechend den

[1]) Heubner, Zur Kenntnis der Energiebilanz des Säuglings. Verhandl. der Ges. f. Kinderheilk. 21, 18.

relativ gar nicht sehr beträchtlichen Bewegungen, die das Kind ausführte (+ 0,69 g CO_2 und + 0,29 g O pro Stunde und Quadratmeter).

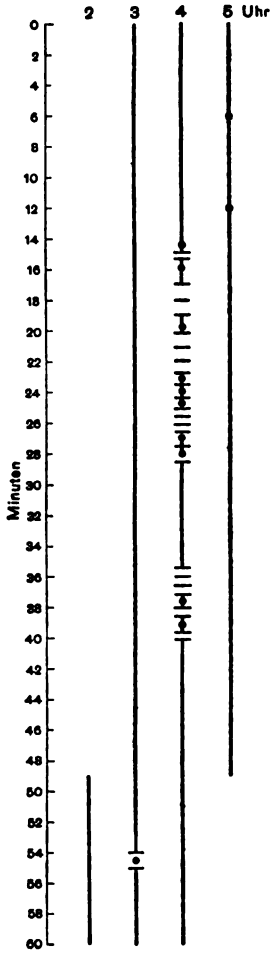


Fig. 5.
Niesmann 21. I.

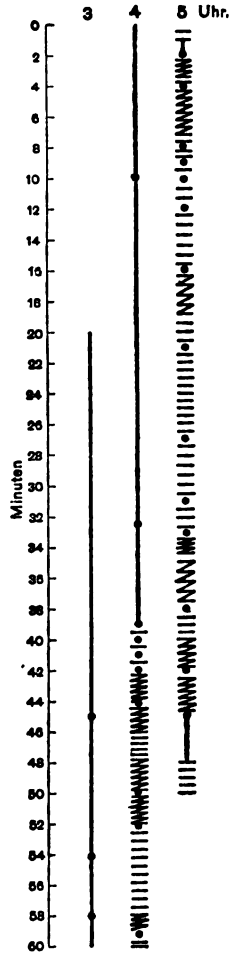


Fig. 6.
Niesmann 19. II.

Ganz anders lag der Fall bei einem Versuche am 19. Februar. Zunächst schlief das Kind musterhaft ruhig gerade 1 Stunde 20 Minuten, erwachte sodann und benahm sich nunmehr ganz ungebärdig, bewegte sich stark, schrie, daß es rot wurde und war nicht zu beruhigen. Nach $2^1/_2$ Stunden wurde

deshalb der Versuch abgebrochen. Wir haben somit einen Versuch vor uns, bei dem das Kind 1 Stunde und 20 Minuten ganz ruhig und 1 Stunde 10 Minuten sehr unruhig war.

Das Ergebnis war folgendes (siehe Protokoll 9 und Fig 6):

Alter 196 Tage, Gewicht 5575 g, Oberfläche 0,3759 qm.

Pro Stunde und Kilogramm		Pro Quadratmeter und Stunde		Respir. Quotient
CO_2: 0,614 l,	O: 0,756 l,	CO_2: 17,85 g,	O: 16,03 g	0,812.

Gegenüber dem relativen Ruheversuch vom 21. Januar fanden wir also:

	am 21. Januar	am 19. Februar
CO_2 pro Kilogramm und Stunde	0,443 l,	0,614 l,
O „ „ „ „	0,537 l,	0,756 l,
CO_2 „ Quadratmeter „ „	12,91 g,	17,85 g,
O „ „ „ „	11,31 g,	16,03 g.

Wir sehen also in diesem Versuche ganz andere Werte, als wir bisher beobachtet haben. Die CO_2-Ausscheidung steigt pro Stunde und Kilogramm von 0,443 l gegenüber dem Versuch 8 auf 0,614 l, der O-Verbrauch von 0,527 l auf 0,756 l. Und auf die Stunde und den Quadratmeter berechnet finden wir ein Anwachsen der CO_2-Produktion von 12,91 g auf 17,85 g und des O-Konsums von 11,31 g auf 16,03 g.

Wie schon erwähnt, verhielt sich das Kind in diesen Versuchen derart, daß es 80 Minuten ganz ruhig schlief und 70 Minuten unruhig war. Wir können daher auch diesen Versuch benutzen, um den Mehrverbrauch an Energie zu berechnen, den die Unruhe bedingt.

Wir nehmen an, daß in den 80 Minuten der Ruhe das Kind pro Quadratmeter so viel CO_2 produziert hat, wie der Durchschnitt in Tabelle II ergibt, also pro Stunde 12,22 g CO_2 und daß dementsprechend der O-Verbrauch 11,02 g war. In 80 Minuten der absoluten Ruhe hatte das Kind demnach pro Quadratmeter 16,29 g CO_2 aus- und 14,69 g O eingeatmet. Während des Versuches 9 hat nun Kind Niesmann auf den Quadratmeter berechnet in $2^1/_2$ Stunden 44,63 g CO_2 produziert und 40,08 g O konsumiert. Ziehen wir die obenstehende Werte für die 80 ruhigen Minuten hiervon ab (44,63 — 16,29 g CO_2 bzw. 40,08 — 14,69 g O), so verbleibt für die 70 unruhigen Minuten pro Quadratmeter 28,34 g CO_2-Bildung und 25,39 g

O-Verbrauch. Auf die Stunde umgerechnet ergibt sich für die Zeit der Unruhe pro Quadratmeter 24,29 g CO_2-Produktion und 21,76 g O-Konsum.

Bei dem anhaltend unruhigen Kinde steigt also pro Stunde und Quadratmeter im Hunger die CO_2-Produktion von 12,22 g auf 24,29 g, der O-Verbrauch von 11,02 g auf 21,76 g, d. h. der Energieumsatz verdoppelt sich durch die Unruhe.

Wir können uns aber auch leicht ein Bild machen, welcher Arbeitsleistung die Unruhe des Kindes entsprach.

Vergleichen wir Versuch 8 und 9, so finden wir, daß in letzterem der O-Verbrauch pro Stunde in der Unruhe um 2,6 l größer gewesen ist als in der Ruhe. [In 3 Stunden Ruhe (Versuch 8) wurden 8,783 l O verbraucht, pro Stunde 2,927 l, in 80 Minuten also 3,903 l]. In Versuch 9 wurden 10,543 l in $2^1/_2$ Stunden verbraucht. Rechnen wir auf die 80 ruhigen Minuten 3,903 l, so bleiben für die 70 unruhigen statt 3,415 l, wie zu erwarten 6,640 l, also 3,225 l mehr, das ist auf 60 Minuten 2,764 l). 1 l O entspricht hier 4,8 Calorien. Wir haben also ein Plus von 13,27 Calorien pro Stunde oder 425 × 13,27 Meterkilogramm Arbeitsleistung, das sind für diese Stunde 5640 Meterkilogramm Arbeit, die als Schreien und Bewegung geleistet wurde. Ein Kind von etwa $5^1/_2$ kg hat somit fast $^1/_5$ der Arbeit geleistet, die ein streng arbeitender Erwachsener von 70 kg zustande bringt. Die Arbeitsleistung des unruhigen Kindes darf also keineswegs gering eingeschätzt werden.

Das Endergebnis hängt natürlich von der Intensität der Bewegungen ab; so zeigt uns ein anderer Versuch mit einem fetten und kräftigen Brustkinde R., Aufnahme Nr. 1910, am 2. Februar folgendes:

Alter 61 Tage, Gewicht 4430 g. Dauer des Versuchs 2 St., davon 1 St. ruhig und 1 St. unruhig. Im ganzen 8,2310 g O-Verbrauch und 9,6405 g CO_2-Produktion, pro Stunde und Kilogramm 0,550 l CO_2 und 0,644 l O, pro Quadratmeter und Stunde in Summa 14,93 g CO_2 und 12,75 g O.

Berechnet man wie vorher, wieviel dabei auf die Ruhezeit und wieviel auf die Bewegungszeit kommt, so findet man, daß letztere eine CO_2-Ausscheidung von 17,64 gegen 12,22 in der Ruhe hat, einen O-Verbrauch von 14,48 gegen 11,02, also eine Vermehrung

des Energieumsatzes um 40 bis 45%. Entsprechend müssen natürlich die stattgehabten Bewegungen weniger intensiv, die Arbeit geringer gewesen sein als bei dem vorher erwähnten Kinde.

Da wir aus früheren Versuchen wissen, wieviel die CO_2-Ausscheidung und der O-Konsum beim ruhenden, aber verdauenden Säugling beträgt, so kommen wir langsam dazu, einen wirklichen Einblick in den Stoff- und Kraftwechsel des Säuglings, so weit er sich in seinem respiratorischen Verhalten spiegelt, zu gewinnen und die einzelnen Komponenten, durch die der Stoffumsatz beeinflußt wird, richtig zu würdigen.

Aber unsere Versuche gestatten uns auch einen Einblick in den wirklichen Nahrungsbedarf des Säuglings, d. h. die Ermittelung der minimalen Werte, deren das Kind für seine Lebensfunktionen bedarf. Als Prämisse nehmen wir dabei an, daß der Säugling am sparsamsten lebt, wenn er seinen Grundbedarf decken muß aus den Beständen seines eigenen Körpers. Nun können wir aber aus den ermittelten CO_2- und O-Werten rechnerisch feststellen, wieviel Calorien das Kind aus seinem Körperbestande zur Verbrennung gebracht hat, ja, wenn wir noch den N-Gehalt des Harns im Hunger kennen, können wir Aufschluß darüber geben, wieviel Eiweiß, wieviel Fett und wieviel Kohlenhydrate verbraucht worden sind.

Über die Eiweißzersetzung im Hunger beim gesunden Säugling ist relativ sehr wenig bekannt; wir haben nur wenige Untersuchungen,[1]) die uns Aufschluß über den N-Gehalt des Harns nach Nahrungsentziehung beim gesunden Kinde geben. Durchschnittswerte, die sich rechnerisch verwenden lassen, liegen jedenfalls noch nicht vor.

Wir sind jetzt damit beschäftigt, Material für die Entscheidung dieser uns wichtig erscheinenden Frist beizubringen, doch sind die Untersuchungen noch bei weitem nicht vorgeschritten genug, um etwa schon heute Durchschnittswerte in unseren Berechnungen einsetzen zu können.

Aber gerade bei einem der 3 Kinder, nämlich Passipen, haben wir den Urin nach 18stündigem Fasten während 6 St. gesammelt und dabei sowohl den N- wie den C-Gehalt er-

---

[1]) Literatur siehe Orgler, Der Eiweißstoffwechsel des Säuglings. Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde 2, 480.

mittelt. Auf 24 Stunden umgerechnet schied das Kind im Hunger 1,4455 g N und 1,1798 g C aus. Die N-Ausscheidung ist dabei auffällig hoch, doch ergab bei einem anderen Kinde von annähernd gleichem Gewicht und Alter der Versuch eine sehr ähnliche Zahl (1,4565 g N), so daß wir wohl den gefundenen Wert in unsere Rechnung einsetzen können. Es würde allerdings dieser N-Gehalt des Harns einem Eiweißzerfall von 9,034 g entsprechen. Wir müssen uns aber erinnern, daß wir es mit einem mageren Kinde zu tun haben, bei dem möglicherweise Eiweißabbau zu calorischen Zwecken mitgedient hat, da eben wenig Fett zur Verfügung stand. Der relative hohe respiratorische Quotient spricht ja auch in diesem Sinne. Wir berechnen also unter Zugrundelegung dieser Werte zunächst, wieviel Fett und Glykogen Kind Passipen im Hunger zugesetzt hat, indem wir den Durchschnitt, der auf Tabelle 2 (S. 22) für Passipen eingesetzt ist, unserer Rechnung zugrunde legen, uns im übrigen der von Rubner inaugurierten Berechnungsart bedienen, die neuerdings von Zuntz sehr übersichtlich dargestellt ist:[1])

Zu jedem Gramm N im Harn des Hungernden kommen 5,923 l O und 4,754 l CO_2, die dem zersetzten Eiweiß zugehören. In unserem Falle kommen also in 24 Stunden von dem eingeatmeten O auf Eiweißzersetzung $1{,}4455 \times 5{,}923$ l O und auf 3 Stunden, die unser Versuch währte, der 8. Teil davon, also $\frac{1{,}4455 \times 5{,}923}{8}$ l O $= \frac{8{,}562}{8}$ l $= 1{,}0702$ l O und von der ausgeatmeten CO_2 $\frac{1{,}4455 \times 4{,}754}{8}$ l $= 0{,}859$ l CO_2.

Der Sauerstoffverbrauch betrug im Durchschnitt beider Versuche in 3 Stunden 7,203 l, ab 1,0702 für Eiweißzersetzung, gibt 6,133 l O und 6,074 l CO_2 ab 0,859 l gibt 5,215 l CO_2.

Der so verbleibende Sauerstoff in Litern minus dem entsprechenden Rest an CO_2 dividiert durch 0,57 ergibt das verbrauchte Fett in Gramm:

$$\text{also: } \frac{6{,}133 - 5{,}215}{0{,}57} = 1{,}61 \text{ g Fett.}$$

---

[1]) Zuntz und Loewy, Lehrb. d. Physiol., F. C. W. Vogels Verlag 1909, S. 661 ff.

Der Fettabbau in 3 Stunden betrug also 1,61 g, in 24 St. würde er somit 12,88 g betragen.

Das Glykogen, das verbraucht wurde, berechnet sich nach der Formel:

$$\frac{b - 1{,}419\,x}{0{,}828}$$

wobei b der oben gefundene CO_2-Rest, also 5,215 und x die oben ermittelte Fettmenge, also 1,610 g ist, somit ist die Glykogenmenge: $\frac{5{,}215 - 1{,}419 \times 1{,}61}{0{,}828} = 3{,}54$ g.

Es wurden also in 3 Stunden 3,54 g Glykogen zersetzt und in 24 Stunden dementsprechend 28,32 g.

Damit kennen wir den Grundumsatz eines Säuglings von 4325 g (Durchschnittsgewicht aus beiden Versuchen), dieser beträgt nämlich für 24 Stunden:

Eiweiß: 9,03 g,
Fett: 12,88 g,
Kohlehydrat: 28,32 g.

Damit wissen wir aber auch wieviel die frei gewordene Energie betrug, die für vitale Arbeitsleistung und Wärmestrahlung nötig war; es sind nämlich frei geworden:

aus 9,03 g	Eiweiß	$9{,}03 \times 4{,}1 =$	37 Calorien,
„ 12,88 g	Fett	$12{,}88 \times 9{,}3 =$	120 „
„ 28,32 g	Kohlenhydrat	$28{,}32 \times 4{,}1 =$	116 „
		also in Summa:	273 Calorien.

Ein Kind von 4325 g Gewicht hat also in 24 Stunden einen Grundumsatz von 273 Calorien, das ist pro Kilogramm 63 Calorien und pro Quadratmeter Oberfläche 859 Calorien, bei einer Temperatur der Umgebung, die bei ca. 20° C liegt.

Wir können aber die Rechnung auch auf eine andere Weise anstellen: abzüglich der 1,0702 l O, die in unserem Falle auf das Eiweiß kommen, verbleiben 6,13 l O, die dei der Fett- und Glykogenverbrennung verbraucht wurden. Da der respiratorische Quotient im Durchschnitt bei Passipen 0,844 war, so ergibt sich, daß 1 l 4,9151 Calorien entspricht; aus Fett- und Glykogenverbrennung wurden daher 29,95 Calorien in 3 Stunden oder 240 Calorien frei; hierzu aus 9,03 g Eiweiß $9{,}03 \times 4{,}1 = 37$ Calorien, das sind 277 Calorien in 24 Stunden.

Aus beiden Berechnungen, die fast genau übereinstimmende Resultate ergeben, kommen wir auf einen Durchschnitt für den Grundumsatz des Säuglings von 275 Calorien bei einem Gewichte von 4325 g.

Damit ergibt sich pro Quadratmeter bei einer Oberfläche von 0,3176 für unser Kind 866 Calorien. Vergegenwärtigen wir uns, was Atwater (S. 585 an der bezeichneten Stelle) für den Erwachsenen J. C. W. direkt beim Hunger nur in der tiefsten Ruhe fand, nämlich im Durchschnitt von nachts 1 Uhr bis früh 7 Uhr pro Quadratmeter in der Stunde 35 Calorien oder in 24 Stunden 840 Calorien, so fällt abermals auf, wie sich in dieser Hinsicht die Verhältnisse beim Säugling und Erwachsenen gleichen.

CO_2-Abgabe und O-Aufnahme sind, so weit sie mit der Verbrennung von Kohlehydraten und Fett zusammen hängen, direkt proportional der Oberfläche: Fett- und Kohlehydratstoffwechsel sind bei gleichen Versuchsbedingungen auf die Oberfläche umgerechnet bei allen annähernd normalen Individuen gleich.

Man wird daher so manches, was wir vom respiratorischen Stoffwechsel des Erwachsenen wissen, mutatis mutandis auf den des Säuglings übertragen können; umgekehrt aber aus den Zahlen, die wir hier ermittelt haben, Rückschlüsse auf die Vorgänge beim Erwachsenen machen können.

Protokolle:

1. Versuch vom 14. September 1909.

Versuchsobjekt: Simons, Elfriede. Alter: 174 Tage.
Gewicht: 5010 g. Oberfläche: 0,3505 qm. Dauer d. Versuchs: 3 St.
Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar.
Anfangswerte:	20,5°	761,5 mm	+ 0,04	+ 0,02
Endwerte:	20,7°	762,0 mm	+ 4,71	+ 1,80

Anfangsvolum: 209,200 l, bei 20,5° C und 761,52 mm Hg = 189,583 l.
Endvolum: 209,200 l, bei 20,5° C und 764,41 mm Hg = 190,409 l.

Analysen der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs:
CO_2 = 0,07%	0,27%	CO_2 = 0,19%
O_2 = 20,86 „	20,00 „	O_2 = 95,00 „
N_2 = 79,07 „	79,73 „	N_2 = 4,81 „
100,00%	100,00%	100,00%

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden . . . . . 39,547 l.
Nachher „ . . . . . 38,082 l.
1,465 l.

Anfangsgewicht des Gasometers . . . = 5,053 kg bei 20,8° und 761,5 mm.
Endgewicht „ „ „ . . . = 12,369 kg bei 20,7° und 762,1 mm.

Zugeführt . . . . . = 6,635 l bei 0° und 760 mm.
Davon ab N_2 in O_2 = 0,319 l.
„ „ CO_2 in O_2 = 0,012 l.
Dazu . . . . . 1,465 l.

Netto-Sauerstoffverbrauch: 7,769 l = 11,102 g.

Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,516 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . . 0,133 l. Aus Lauge . . . . . = 6,202 l CO_2.
Nachher „ . . . 0,514 l. Ges.-Kohlensäureprod. = 6,583 l
0,381 l. = 12,8988 g.

Kohlensäure pro kg und Stunde = 0,438 l; Respirator. Quotient = 0,847.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 149,903 l;
Nachher „ 151,813 l; N_2 aus O_2 (4,81%) = 0,319 l;
1,910 l;
Differenz = + 1,591 l.

Bemerkung: Es wurden somit pro Stunde und Quadratmeter 12,27 g CO_2 produziert und 10,56 g O konsumiert.

2. Versuch vom 20. September 1909.

Versuchsobjekt: Simons, Elfriede. Alter: 180 Tage.

Gewicht: 5115 g. Oberfläche: 0,3553 qm. Dauer d. Versuchs: 3 St.

Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar.
Anfangswerte:	21,7°	756,7 mm	+ 0,02	+ 0,03
Endwerte:	20,8°	756,9 mm	+ 0,35	− 1,34

Anfangsvolum: 209,050 l, bei 21,7° C und 756,7 mm Hg = 187,150 l.
Endvolum: 209,050 l, bei 21,7° C und 758,39 mm Hg = 187,582 l.

Analysen der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs:
CO_2 = 0,07%	0,23%	CO_2 = 0,14%
O_2 = 20,86 „	20,01 „	O_2 = 95,33 „
N_2 = 79,07 „	79,76 „	N_2 = 4,53 „
100,00%	100,00%	100,00%

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden . . . . . 39,039 l.
Nachher „ . . . . . 37,536 l.
1,503 l.

Anfangsgewicht des Gasometers . . = 5,002 kg bei 756,7 mm und 20,4° C.
Endgewicht „ „ . . = 12,630 kg bei 756,9 mm und 20.8° C.

Zugeführt . . . . . = 6,881 l bei 760 mm und 0°.
Davon ab N_2 in O_2 = 0,312 l.
„ „ CO_2 in O_2 = 0,009 l.
Dazu . . . . . 1,503 l.

Netto-Sauerstoffverbrauch: 8,063 l = 11,5221 g.

Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,525 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . . 0,131 l. Aus Lauge . . . . . = 6,346 l CO_2.
Nachher „ . . . 0,431 l. Ges.-Kohlensäureprod. = 6,646 l.
0,300 l. = 13,0224 g.

Kohlensäure pro kg und Stunde = 0,433 l; Respirator. Quotient = 0,824.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 147,979 l;
Nachher „ 149,618 l; N_2 aus O_2 (4,53%) = 0,312 l;
1,639 l;
Differenz + 1,327 l.

Bemerkung: Es wurden somit pro Stunde und Quadratmeter 12,22 g CO_2 produziert und 10,81 g O konsumiert.

3. Versuch vom 16. September 1909.

Versuchsobjekt: Passipen, Johanna. Alter: 149 Tage.
Gewicht: 4220 g. Oberfläche: 0,3124 qm. Dauer des Versuchs: 3 St.
Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar.
Anfangswerte:	22,0°	760,6 mm	+ 0,05	+ 0,03
Endwerte:	21,0°	761,0 mm	+ 2,28	− 0,97

Anfangsvolum: 210,060 l, bei 22,0° C und 760,62 mm Hg = 188,774 l.
Endvolum: 210,060 l, bei 22,0° C und 763,85 mm Hg = 189,589 l.

Analysen

der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs:
CO_2 = 0,07%	0,19%	CO_2 = 0,06%
O_2 = 20,86 „	20,25 „	O_2 = 95,53 „
N_2 = 79,07 „	79,56 „	N_2 = 4,41 „
100,00%	100,00%	100,00%

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden . . . . . 39,379 l.
Nachher „ . . . . . 38,392 l.
0,987 l.

Anfangsgewicht des Gasometers = 5,333 kg bei 20,7° und 760,8 mm.
Endgewicht „ „ = 12,159 kg bei 21,0° und 761,0 mm.

Zugeführt . . . . . = 6,185 l bei 0° und 760 mm.
Davon ab N_2 in O_2 = 0,273 l.
„ „ CO_2 in O_2 = 0,003 l.
Dazu . . . . . 0,987 l.

Netto-Sauerstoffverbrauch: 6,896 l = 9,8554 g.

Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,544 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . . 0,132 l; Aus Lauge . . . . . = 5,681 l CO_2.
Nachher „ . . . 0,360 l. Ges.-Kohlensäureprod. = 5,909 l.
0,228 l. = 11,5781 g.

Kohlensäure pro kg und Stunde = 0,466 l; Respirator. Quotient = 0,856.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 149,263 l;
Nachher „ 150,838 l; N_2 aus O_2 (4,41%) = 0,273 l;
1,575 l;
Differenz = + 1,302 l.

Bemerkung: Es wurden pro Quadratmeter und Stunde 12,35 g CO_2 produziert und 10,52 g O konsumiert.

4. Versuch vom 6. Oktober 1909.

Versuchsobjekt: Passipen, Johanna. Alter 169 Tage. Gewicht: 4430 g. Oberfläche: 0,3228 qm. Dauer d. Versuchs: 3 St.
Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar.
Anfangswerte:	21,8°	755,9 mm	+ 0,05	− 0,05
Endwerte:	20,8°	758,2 mm	− 1,00	− 3,01

Anfangsvolum: 209,820 l, bei 21,8° C und 755,8 mm Hg = 187,518 l.
Endvolum: 209,820 l, bei 21,8° C und 757,91 mm Hg = 188,052 l.

Analysen

der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs:
CO_2 = 0,07%	0,32%	CO_2 = 0,19%
O_2 = 20,86 „	20,00 „	O_2 = 95,08 „
N_2 = 79,07 „	79,68 „	N_2 = 4,76 „
100,00%	100,00%	100,00%

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden . . . . . 39,166 l.
Nachher „ . . . . . 37,611 l.
1,505 l.

Anfangsgewicht des Gasometers = 4,508 kg bei 20,5° und 755,9 mm.
Endgewicht „ „ = 11,550 kg bei 20,8° und 758,2 mm.

Zugeführt . . . . . = 6,316 l bei 0° und 760 mm.
Davon ab N_2 in O_2 = 0,300 l.
„ „ CO_2 in O_2 = 0,011 l.
Dazu . . . . . 1,505 l.
Netto-Sauerstoffverbrauch: 7,511 l = 10,7332 g.

Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,564 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . . 0,131 l. Aus Lauge . . . . . = 5,769 l CO_2.
Nachher „ . . . 0,602 l. Ges.-Kohlensäureprod. = 6,240 l.
0,471 l. = 12,2266 g.

Kohlensäure pro kg und Stunde: 0,469 l; Respirator. Quotient = 0,832.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 148,269 l;
Nachher „ 149,841 l;
1,572 l; N_2 aus O_2 (4,76%) = 0,300 l.

Differenz = + 1,272 l.

Bemerkung: Es wurden somit 12,64 g CO_2 pro Stunde und Quadratmeter produziert und 11,08 g O konsumiert.

5. Versuch vom 9. Februar 1910.

Versuchsobjekt: Lübbert, Elfriede. Alter: 87 Tage.
Gewicht: 4980 g. Oberfläche: 0,3491 qm. Dauer d. Versuchs: 3 St.
Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar.
Anfangswerte:	19,9°	761,9 mm	+ 0,14	− 0,04
Endwerte:	20,4°	764,1 mm	+ 4,07	+ 0,96

Anfangsvolum: 209,30 l, bei 19,9° C und 762,08 mm Hg = 190,486 l.
Endvolum: 209,30 l, bei 19,9° C und 765,01 mm Hg = 191,227 l.

Analysen

der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs:
CO_2 = 0,07%	1,69%	CO_2 = 0,05%
O_2 = 20,86 „	18,19 „	O_2 = 97,50 „
N_2 = 79,07 „	80,12 „	N_2 = 2,45 „
100,00%	100,00%	100,00%

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden . . . . . 39,735 l.
Nachher „ . . . . . 34,784 l.
4,951 l.

Anfangsgewicht des Gasometers = 4,012 kg bei 20,9° und 761,4 mm Hg.
Endgewicht „ „ = 8,534 kg bei 20,4° und 764,1 mm Hg.

Zugeführt . . . . . = 4,111 l bei 0° und 760 mm.
Davon ab N_2 in O_2 = 0,101 l.
„ „ CO_2 in O_2 = 0,002 l.
Dazu . . . . . 4,951 l.
Netto-Sauerstoffverbrauch: 8,959 l = 12,802 g.

Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,599 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . . 0,133 l. Aus Lauge . . . . . = 3,488 l CO_2.
Nachher „ . . . 3,232 l. Ges.-Kohlensäureprod. = 6,587 l.
3,099 l. = 12,907 g.

Kohlensäure pro kg und Stunde = 0,441 l; Respirator. Quotient = 0,73.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 150,617 l;
Nachher „ 153,211 l;
2,594 l; N_2 aus O_2 (2,45%) = 0,101 l;

Fehler = + 2,493 l.

Bemerkung: Es wurden somit pro Stunde und Quadratmeter 12,83 g CO_2 produziert und 12,22 g O konsumiert.

6. Versuch vom 15. Februar 1910.

Versuchsobjekt: Lübbert, Elfriede. Alter: 93 Tage.

Gewicht: 5050 g. Oberfläche: 0,3519 qm. Dauer des Versuchs: 3 St.

Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar
Anfangswerte:	21,4°	738,0 mm	+ 0,06	− 0,04
Endwerte:	20,7°	738,0 mm	+ 3,85	− 1,40

Anfangsvolum: 209,200 l, bei 21,4° C und 738,1 mm Hg = 182,848 l.
Endvolum: 209,200 l, bei 21,4° C und 743,25 mm Hg = 184,152 l.

Analysen

der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs:
CO_2 = 0,07%	0,81%	CO_2 = 0,07%
O_2 = 20,86 „	19,02 „	O_2 = 97,34 „
N_2 = 79,07 „	80,17 „	N_2 = 2,59 „
100,00%	100,00%	100,00%

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden	38,142 l.
Nachher „	35,026 l.
	3,116 l.

Anfangsgewicht des Gasometers = 4,132 kg bei 20,8° und 738,1 mm Hg.
Endgewicht „ „ = 9,930 kg bei 20,7° und 738,0 mm Hg.

Zugeführt	= 5,091 l bei 0° und 760 mm.
Davon ab N_2 in O_2	= 0,132 l.
„ „ CO_2 in O_2	= 0,003 l.
Dazu	3,116 l.
Netto-Sauerstoffverbrauch:	8,072 l = 11,5347 g.

Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,534 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . .	0,128 l.	Aus Lauge	= 4,821 l CO_2;
Nachher „ . . .	1,491 l.	Ges.-Kohlensäureprod.	= 6,184 l.
	1,363 l.		= 12,1172 g.

Kohlensäure pro kg und Stunde = 0,409 l; Respirator. Quotient = 0,76.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 144,577 l;
Nachher „ 147,631 l;
3,054 l;
N_2 aus O_2 (2,59%) = 0,132 l;
Fehler = + 2,922 l.

Bemerkung: Es wurden somit pro Stunde und Quadratmeter 11,48 g CO_2 produziert und 10,93 g O konsumiert.

7. Versuch vom 18. Oktober 1909.

Versuchsobjekt: Passipen, Johanna. Alter: 181 Tage.

Gewicht: 4410 g. Oberfläche: 0,3218 qm. Dauer d. Versuchs: 6½ St.

Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar.
Anfangswerte:	21,2°	754,6 mm	± 0,00	± 0,00
Endwerte:	20,5°	756,3 mm	+ 2,80	− 2,35

Anfangsvolum: 208,72 l, bei 21,2° C und 754,6 mm Hg = 186,809 l.
Endvolum: 208,725 l, bei 21,2° C und 759,75 mm Hg = 188,122 l.

Analysen der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs: I.	II.
CO_2 = 0,07 %	0,36 %	CO_2 = 0,36 %	0,12 %
O_2 = 20,86 „	20,17 „	O_2 = 95,60 „	95,74 „
N_2 = 79,07 „	79,47 „	N_2 = 4,04 „	4,14 „
100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden . . . . . 38,968 l.
Nachher „ . . . . . 37,945 l.
1,023 l.

Anfangsgewicht des Gasometers I = 4,345 kg bei 755,0 mm und 18,6° C.
Endgewicht „ „ I = 13,569 kg bei 756,3 mm und 20,5° C.
Zugeführt . . . . . = 8,391 l bei 0° und 760 mm.
Anfangsgewicht des Gasometers II = 4,557 kg bei 20,4° und 754,5 mm.
Endgewicht „ „ II = 13,522 kg bei 20,5° und 755,0 mm.
Zugeführt . . . . . = 8,076 l bei 0° und 760 mm.
Davon ab N_2 in O_2 = 0,673 l.
„ „ CO_2 in O_2 = 0,039 l.
Dazu . . . . . 1,023 l.
Netto-Sauerstoffverbrauch: 16,778 l = 23,9756 g.
Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,585 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . . 0,131 l. Aus Lauge . . . . . = 13,706 l CO_2.
Nachher „ . . . 0,677 l. Ges.-Kohlensäureprod. = 14,252 l.
0,546 l. = 27,9253 g.
Kohlensäure pro kg und Stunde = 0,497 l; Respirator. Quotient = 0,849.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 147,710 l;
Nachher „ 149,500 l;
1,790 l;
N_2 aus O_2 (4,04 % / 4,14 „) = 0,673 l;
Differenz = + 1,117 l.

Bemerkung: Das Kind war etwa ½ Stunde recht unruhig. Die CO_2-Produktion betrug pro Quadratmeter und Stunde 13,35 g, der O-Verbrauch 11,46 g.

8. Versuch vom 21. Januar 1910.

Versuchsobjekt: Niesmann, Wilhelmine. Alter: 168 Tage.
Gewicht: 5440 g. Oberfläche: 0,3699 g. Dauer des Versuchs: 3 St.
Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar.
Anfangswerte:	21,9°	748,1 mm	+ 0,17	− 0,10
Endwerte:	20,7°	748,9 mm	+ 3,62	− 3,41

Anfangsvolum: 209,110 l, bei 21,9° C und 748,37 mm Hg = 184,897 l.
Endvolum: 209,110 l, bei 21,9° C und 755,13 mm Hg = 186,609 l.

Analysen

der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs:
$CO_2 = 0{,}07\%$	$0{,}22\%$	$CO_2 = 0{,}09\%$
$O_2 = 20{,}86$ „	$20{,}04$ „	$O_2 = 98{,}01$ „
$N_2 = 79{,}07$ „	$79{,}74$ „	$N_2 = 1{,}90$ „
$100{,}00\%$	$100{,}00\%$	$100{,}00\%$

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden . . . . . 38,569 l.
Nachher „ . . . . . 37,396 l.
1,173 l.

Anfangsgewicht des Gasometers = 4,158 kg bei 748,2 mm und 20,6°.
Endgewicht „ „ = 12,863 kg bei 748,9 mm und 20,7°.

Zugeführt . . . . . = 7,765 l bei 0° und 760 mm.
Davon ab N_2 in O_2 = 0,148 l.
„ „ CO_2 in O_2 = 0,007 l.
Dazu . . . . . 1,173 l.
Netto-Sauerstoffverbrauch: 8,783 l = 12,551 g.

Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,537 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . . 0,129 l. Aus Lauge . . . . . = 6,968 l CO_2
Nachher „ . . . 0,411 l. Ges.-Kohlensäureprod. = 7,250 l.
0,282 l. = 14,206 g.

Kohlensäure pro kg und Stunde = 0,443 l; Respirator. Quotient = 0,825.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 146,196 l;
Nachher „ 148,803 l; N_2 aus O_2 (1,90%) = 0,148 l;
+ 2,607 l;
Fehler = + 2,459 l.

Bemerkung: Das Kind produzierte 12,91 g CO_2 pro Quadratmeter und Stunde und verbrauchte 11,31 g O.

9. Versuch vom 19. Februar 1910.

Versuchsobjekt: Niesmann, Wilhelmine. Alter: 196 Tage. Gewicht: 5575 g. Oberfläche: 0,3759 qm. Dauer d. Versuchs: $2^1/_2$ St. Ernährung: Hunger.

	Temperatur	Bar. corr.	Manometer	Thermobar.
Anfangswerte:	21,9°	746,7 mm	+ 0,07	− 0,04
Endwerte:	20,6°	746,4 mm	− 0,95	− 1,20

Anfangsvolum: 208,680 l, bei 21,9° C und 746,81 mm Hg = 184,121 l.
Endvolum: 208,680 l, bei 21,9° C und 746,95 mm Hg = 184,158 l.

Analysen

der Anfangsluft:	der Endluft:	des Sauerstoffs:
$CO_2 = 0{,}07\%$	$0{,}77\%$	$CO_2 = 0{,}08\%$
$O_2 = 20{,}86$ „	$18{,}60$ „	$O_2 = 97{,}63$ „
$N_2 = 79{,}07$ „	$80{,}63$ „	$N_2 = 2{,}29$ „
$100{,}00\%$	$100{,}00\%$	$100{,}00\%$

Sauerstoffbilanz:

Vorher vorhanden . . . . . 38,407 l.
Nachher „ . . . . . 34,253 l.
4,154 l.

Anfangsgewicht des Gasometers = 4,055 kg bei 20,6° und 746,9 mm.
Endgewicht „ „ = 11,409 kg bei 20,6° und 746,2 mm.

Zugeführt . . . . . = 6,544 l bei 0° und 760 mm.
Davon ab N_2 in O_2 = 0,150 l.
„ „ CO_2 in O_2 = 0,005 l.
Dazu . . . . . 4,154 l.

Netto-Sauerstoffverbrauch: 10,543 l = 15,0659 g.

Sauerstoffverbrauch pro Kilogramm und Stunde = 0,756 l.

Kohlensäurebilanz:

Vorher vorhanden . . . 0,129 l. Aus Lauge . . . . . = 7,273 l CO_2
Nachher „ . . . 1,418 l. Ges.-Kohlensäureprod. = 8,562 l.
1,289 l. = 16,777 g.

Kohlensäure pro kg und Stunde = 0,614 l; Respirator. Quotient = 0,812.

Stickstoffbilanz:

Vorher vorhanden 145,583 l;
Nachher „ 148,486 l;
2,903 l; N_2 aus O_2 (2,29%) = 0,150 l;

Fehler = + 2,65 l.

Bemerkung: Das Kind war zwischen diesem und dem Versuch 8 abgestillt worden. Die CO_2-Produktion pro Quadratmeter und Stunde war 17,85 g, der O-Verbrauch 16,03 g.

Über Lipoide.

Von

Sigmund Fränkel.

X. Mitteilung.

Über den Nachweis von Galaktose in Lipoiden.

Von

Kurt Linnert.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung; Wien.)

(Eingegangen am 14. April 1910.)

Die gebräuchlichste Methode, Galaktose nachzuweisen, besteht in der Überführung derselben in Schleimsäure durch Oxydation mit Salpetersäure von 1,15 sp. G. Die Schleimsäure ist durch ihre Wasserunlöslichkeit, die sandigen, knirschenden Krystalle und ihren Schmelzpunkt von 225° charakterisiert.

Wir verwenden, um uns schnell darüber zu orientieren, ob die Lipoide Galaktoside oder mit Galaktosephosphorsäuren kombinierte Verbindungen sind, oder ob ein Präparat mit galaktosehaltigen Substanzen verunreinigt ist, die Orcin-Eisenchlorid-Salzsäure-Reaktion, die so ausgeführt wird, daß wir in einer Eprouvette der zu untersuchenden Substanz einige Körnchen Orcin, einen Tropfen Eisenchloridlösung und etwa 10 ccm rauchende konz. Salzsäure oder einfach Obermayers Reagens (1 l konz. Salzsäure, 4 g Eisenchlorid) zusetzen und kochen. Je nach dem Gehalte der Galaktose tritt nach kürzerem oder längerem Kochen eine grünliche bis blaugrüne Färbung auf. Der Farbstoff läßt sich mit Amylalkohol aufnehmen.

Freilich ist die Orcinreaktion durchaus keine für Galaktose spezifische; war sie doch für Pentosen angegeben worden, aber

sehr bald wurde der Beweis erbracht, daß sie auch bei Hexosen und Glucuronsäuren [Tollens, E. C. van Leersum[1])], sogar bei Eiweißarten, die eine Kohlenhydratgruppe enthalten [Bial[2])], positiv ausfalle. Da es aber bisher nicht gelungen ist, außer der Galaktose ein anderes Kohlenhydrat in den Gehirnlipoiden nachzuweisen, so ist wohl für diesen speziellen Zweck die Orcinreaktion spezifisch für Galaktose. Die von Levene stammende Angabe, daß er im Gehirnprotagon Pentosen mittels Orcin gefunden habe, ist wohl auf eine irrige Deutung der Orcinreaktion seinerseits zurückzuführen. Diese Angabe findet sich in einer Mitteilung W. Kochs.[3]) Sie ist übergegangen in das Oppenheimersche Handbuch der Biochemie 2, 2 T., S. 289 und ist als irrtümlich zu streichen. Wie empfindlich die Orcinprobe für Galaktose ist, geht aus Kontrollversuchen hervor, die wir mit reinstem Kahlbaumschen Präparat anstellten. Dieselben ergaben, daß bei Verdünnungen von 1:1000 eine deutlich blaugrüne Färbung auftrat, bei solchen von 1:5000 noch eine ausgesprochene grüne, und erst bei Lösungen von 1:10000 die Reaktion versagte.

Den strikten Beweis, daß ein Gehirnlipoid Galaktose enthalte, führen wir, indem wir nach beendeter Hydrolyse die Galaktose

1. in das α-Methylphenylhydrazon überführen,
2. dieselbe rein darstellen.

1. Die mineralsaure Lösung der Galaktose wird mit Natriumacetat im Überschuß bis zum Verschwinden der blauen Kongoreaktion versetzt und α-Methylphenylhydrazin hinzugefügt und kurze Zeit, 5 Minuten, im Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten wird der entstandene Niederschlag auf dem Filter mit kaltem Wasser gewaschen und zwei- bis dreimal aus absolutem Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt und krystallographischer Befund sind durchaus charakteristisch für diesen Körper. Schon Lobry de Bruyn und van Eckenstein[4]) haben dieses Hydrazon dargestellt und den Schmelzpunkt mit 180° angegeben. Morrell und Crofts[5]) haben aber für ein Prä-

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 510.
[2]) Zeitschr. f. klin. Med. 50, 417.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 496, 1907.
[4]) Rech. des trav. chim. des Pays Bas 15, 226.
[5]) Journ. of the chemical Society of London 75, 790.

parat F. 187° unter Zersetzung angegeben. Unser aus dem Gehirn unter den angegebenen Bedingungen gewonnenes Hydrazon gab aber einen Schmelzpunkt von 189° (unc.). Unsere Präparate schmelzen glatt ohne Zersetzung, das aus reinster Galaktose dargestellte Hydrazon sogar bei 190° (unc.), eine Mischprobe beider zeigte kein Absinken des Schmelzpunktes, so daß wir uns für berechtigt halten, den Schmelzpunkt des Galaktose-α-methylphenylhydrazons mit 190° (unc.) anzugeben. C. Neuberg[1]) hat schon früher den Schmelzpunkt des Galaktose-methylphenylhydrazons zu 191° angegeben und die Krystalle als prismatische Säulen (nach dem Umkrystallisieren aus heißem Wasser) bezeichnet.

Den krystallographischen Befund verdanken wir der Liebenswürdigkeit der Fr. Dr. H. Gerhart vom mineralogisch-petrogr. Universitätsinstitut Wien: Silberglänzende, rhombische Täfelchen von nahezu quadratischer Begrenzung, Auslöschung in der Diagonale. Auf der Fläche des Blättchens tritt genau zentrisch die erste positive Mittellinie auf; Achsenwinkel schätzungsweise zwischen 60° und 70°, Achsenebene in der längeren Diagonale. Doppelbrechung nicht besonders hoch, ebenso Lichtbrechung.

2. Die Reindarstellung der Galaktose ist zuerst Thudichum[2]) gelungen, der das gewonnene Kohlenhydrat als Cerebrose bezeichnete. Den Beweis, daß Thudichums Cerebrose mit d-Galaktose identisch sei, hat Thierfelder[3]) erbracht. Wir empfehlen für die direkte Reindarstellung der Galaktose aus Lipoiden folgenden Vorgang: Nach durchgeführter, meist schwefelsaurer Hydrolyse wird nach Gewinnung der Fettsäure und Base die Schwefelsäure in der Mutterlauge durch Ätzbaryt und Bariumcarbonat exakt neutralisiert, das Filtrat durch Vakuum-Destillation zum dünnen Sirup eingeengt, dieser mit wenig absolutem Methylalkohol ausgekocht, filtriert und mit viel Äther versetzt. Im Laufe von Tagen, besonders wenn die Wände des Gefäßes angerieben werden, krystallisiert die Galaktose in einer feinkrystallinischen Kruste aus. Durch einmaliges Umkrystallisieren aus Methylalkohol erhält man sie analysenrein.

[1]) Diese Zeitschr. 3, 591, 1907.
[2]) Chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 209.

Über Lipoide.

Von

Sigmund Fränkel.

XI. Mitteilung.

Vergleichend-chemische Gehirnuntersuchungen.

Von

Kurt Linnert.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung, Wien.)

(Eingegangen am 14. April 1910.)

Physiologie, vergleichende und pathologische Anatomie haben unsere Kenntnisse über das Gehirn und seine Funktionen wesentlich erweitert, nur unser Wissen über den Chemismus desselben ist kaum über die Anfangsgründe hinaus gekommen.

Seit den Untersuchungen Chossats steht die Tatsache fest, daß das Gehirn selbst bei lange fortgesetztem Hungern nur sehr wenig von seinem ursprünglichen Gewicht verliert. Zur Erklärung dieser merkwürdigen Tatsache hat man angenommen, daß der Organismus zur Schonung seines edelsten Organes das zur Erhaltung nötige Brennmaterial früher allen anderen Geweben entnimmt und dem Gehirn auch im Hunger für dessen eigenen Stoffwechsel Substanzen zuführt, so daß die Gewebssubstanzen des Gehirns nicht angegriffen werden. Wir wissen ja aus den Mieschers chen Beobachtungen am Rheinlachs, daß während der Geschlechtsperiode dieses Tier im Süßwasser hungert, dabei aber die Geschlechtsorgane nicht nur ihren Bestand wahren, sondern an Substanz unverhältnismäßig, und zwar auf Kosten der einschmelzenden Rumpfmuskulatur zunehmen (Mieschers Liquidation). Eine gleiche Vorstellung wäre für das Zentralnervensystem hungernder Tiere zulässig.

Diese Tatsache, daß das Gehirn im Hunger kaum an Gewicht verliert, ist seither mehrfach bestätigt worden. Die Erklärungen hierfür aber differieren stark. Eine andere Erklärung vermeint wieder, daß der Stoffwechsel des Gehirns ein so träger sei, daß der auf das Gehirn entfallende Anteil der Verbrennungsprozesse im Vergleich zu denen des übrigen Körpers kaum in die Wagschale falle. Die älteren Angaben der Stoffwechselphysiologen gehen dahin, daß im Schlaf der Gaswechsel weitaus geringer als im Wachzustande sei. Aber es konnte gezeigt werden, daß nicht der Schlaf den Gaswechsel herabsetzt, sondern die niedrigeren Werte für die Verbrennung daher rühren, daß im Wachzustande keine vollkommene Muskelruhe herrscht und daher die Differenz zwischen Schlaf und Wachzustand stammt. A. Loewy[1]) wies dann nach, daß der Sauerstoffverbrauch beim Wachen und im Schlafe ganz unwesentlich verschieden und die Differenz durch die im Schlafe kleinere Atemarbeit zu erklären sei. Zu genau gleichem Resultate kam Johannson[2]).

Tatsächlich schienen die Ergebnisse der Untersuchungen von Speck[3]) und Johannson[4]), die lehren, daß der Sauerstoffverbrauch des arbeitenden und des schlafenden Gehirns fast derselbe sei, in diesem Sinne zu sprechen. Gerade zu gegenteiliger Anschauung aber zwingen die Befunde Wintersteins[5]), der zeigte, daß der Sauerstoffverbrauch des Zentralnervensystems des Frosches fünfmal größer sei als der des übrigen Körpers, und weiter die bekannte Erfahrung, daß das Gehirn auf ungenügende Sauerstoffzufuhr sofort mit schweren Funktionsstörungen reagiert.

Endlich könnte die Resistenz des Gehirns gegen die Abnahme seines Gewichtes noch erklärt werden, wenn der Calorienwert seiner Konstituenzien ein so hoher wäre, daß schon die Verbrennung geringer Mengen desselben genügte, um die für die Funktionstätigkeit nötige Energie aufzubringen. In der Tat haben im hiesigen Laboratorium nach dieser Richtung ausgeführte Untersuchungen gelehrt, daß der Calorienwert einer

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1891, 437.
[2]) Skand. Arch. 8, 1898 und 11.
[3]) Physiologie des menschlichen Atmens, Leipzig 1892.
[4]) Skand. Arch. 11.
[5]) Zeitschr. f. allg. Physiol. 6, 315.

Reihe von Lipoiden den der höchstwertigen Fette nicht nur erreicht, sondern sogar übertrifft.

In diese verworrenen und durchaus ungeklärten Verhältnisse glaubten wir durch das Studium der Gehirnlipoide fördernd eingreifen zu können. Daß diese bei ihren bedeutungsvollen physikalischen und chemischen Eigenschaften (hoher Calorienwert, enorme Sauerstoffavidität der ungesättigten Phosphatide) eine hervorragende Rolle im chemischen Haushalt des Gehirns spielen, ist wohl mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen. Das chemische Studium der Gehirnsubstanzen hat gezeigt, daß die Hauptmasse der extrahierbaren Stoffe (Lipoide) stark ungesättigt und ungemein sauerstoffavid ist, und auf diese Eigenschaft, auf die Fähigkeit, an dem Orte der doppelten Bindung der ungesättigten Kette atmosphärischen, molekularen Sauerstoff anzulagern und durch Umwandlung in atomistischen ihn zur Oxydation leicht oxydabler Körper der Gewebe geeignet zu machen, haben Sigmund Fränkel und Ludwig Dimitz[1]) ihre Theorie über Gewebeatmung durch Intermediärkörper aufgebaut.

Unser Gedankengang war folgender: Wenn es gelänge, zu zeigen, daß bestimmten Funktionsstörungen des Gehirns konstant Veränderungen im Gehalt oder in der Gruppierung der Lipoide entsprechen, so wäre damit die Möglichkeit gegeben, dem Verständnis der funktionellen Bedeutung dieser Körper und damit auch dem Chemismus des Gehirns näher zu kommen. Nun sind die physiologischen Verhältnisse gar nicht bekannt. Diese selbst aber müssen für die Entwicklung in der Phylogenese und Ontogenese die interessantesten Tatsachen beim Studium liefern, wenn es nur gelingt, mit genügender Präzision die Gruppen der verschiedenen Phosphatide und der übrigen Lipoide voneinander zu trennen.

Zu diesem Zwecke erschien es uns notwendig, uns zunächst über den Gehalt normaler Gehirne an Lipoiden und über die Verteilung derselben in einzelnen Abschnitten des Gehirns zu orientieren. Wir unterscheiden folgende Gruppen der Lipoide, die wir mit genügender Sicherheit kennen und zu trennen vermögen. Wir können innerhalb der Hauptgruppen besondere sehr wichtige Substanzen ohne eingehende präparative Arbeit quantitativ bestimmen:

1. die Gruppe der Cholesterine;

[1]) Wiener klin. Wochenschr. 1909, Nr. 51.

2. die ungesättigten Phosphatide (Kephaline, Myeline, Sahidin);

3. die gesättigten Phosphatide, Sphingogalaktoside, Sulfatide.

Wir haben nach S. Fränkels Methode der fraktionierten Extraktion[1]) der Gehirnlipoide eine Reihe von Tierhirnen, das Hirn des Kindes im Gegensatz zu Erwachsenen, ferner vom menschlichen Gehirn die Rinde, das Mark, Brücke und verlängertes Mark, Kleinhirn und endlich, um die Unterschiede zwischen Gehirn und Rückenmark zu illustrieren, das Rückenmark und Hirn des Rindes jedes für sich untersucht und die Ergebnisse unserer Untersuchungen in der nachfolgenden Tabelle (siehe S. 50) zusammengestellt.

Wenn auch die Zahl der Untersuchungen eine relativ geringe ist, so glauben wir doch mit einiger Berechtigung folgende interessante Tatsachen aus dem gewonnenen Zahlenmaterial ableiten zu dürfen.

Untersucht man das Gesamthirn höher organisierter Tiere aufsteigend bis zum Menschen, so sieht man, daß die Unterschiede nur innerhalb geringer Grenzen schwanken, mit anderen Worten: das Verhältnis zwischen Trockensubstanz, Gesamtlipoiden und den einzelnen Gruppen der letzteren ist in der Phylogenese ein ziemlich konstantes.

Die Masse des Gehirns wächst an Gewicht entsprechend dem zunehmenden Körpergewicht, das Verhältnis der einzelnen chemischen Bestandteile zum Gehirn ist aber innerhalb geringer Grenzen dasselbe.

Beim Vergleich der Veränderungen des wachsenden Rinder- und Menschenhirns konstatiert man bei beiden eine Zunahme der Trockensubstanz und der Gesamtlipoide mit dem Wachstum des Individuums; beim Menschen nehmen letztere allerdings viel auffälliger zu. Im Verhalten der einzelnen Fraktionen aber ist ein noch viel auffälligerer Unterschied: Beim Rinderhirn ist der Acetonextrakt fast doppelt so groß als beim Kalbshirn, die ungesättigten Phosphatide des Petrolätherextraktes nehmen mit der Entwicklung des Gehirns ab, die gesättigten nehmen nur ganz mäßig zu. Beim wachsenden Menschenhirn aber bleibt der Acetonextrakt fast unverändert, die ungesättigten Phosphatide nehmen zu, die gesättigten nehmen ab.

[1]) Diese Zeitschr. 19, 254.

Ganz anders gestalten sich die Verhältnisse, wenn man in gleicher Weise einzelne Abschnitte des Gehirns untersucht. Vergleicht man zunächst Rinde und weiße Substanz des menschlichen Gehirns — wobei allerdings darauf zu achten ist, daß beide, soweit es makroskopisch möglich ist, peinlich genau herauspräpariert werden —, so läßt sich die bekannte Tatsache, daß die weichere Rinde wasserreicher ist als das zähere Mark, zahlenmäßig bestätigen. Die Trockensubstanz der Rinde besteht nicht einmal zur Hälfte aus Lipoiden, diejenige der weißen Substanz fast zu drei Vierteln. Trotz der scheinbaren Gleichheit in den Prozentzahlen der Acetonextrakte von Rinde und Mark besteht eine auffallende Differenz in ihrer Zusammensetzung: Der Acetonextrakt der weißen Substanz besteht zum größten Teil aus Cholesterin; die Rinde aber ist arm an Cholesterin, und ihr Acetonextrakt enthält vorwiegend ein ungesättigtes Phosphatid. Die von Petroläther aufgenommenen ungesättigten Phosphatide der Rinde verhalten sich zu denen der weißen Substanz annähernd wie 2:3; umgekehrt ist die Rinde reicher an gesättigten Lipoiden als das Mark.

Brücke und verlängertes Mark sind nach der weißen Substanz die wasserärmsten Anteile des menschlichen Gehirns. Auffallend sind in den beiden untersuchten Fällen die enormen Differenzen in den Zahlen sowohl der Gesamtlipoide als auch ihrer Fraktionen trotz völlig gleichen Wassergehaltes. Ob schon unter normalen Verhältnissen derartige bedeutende Schwankungen vorkommen, darüber müssen weitere ausgebreitetere Untersuchungen Aufklärung bringen.

Das Kleinhirn nähert sich in seinen Verhältniszahlen sehr der Rinde; es ist wasserreich und lipoidarm; die Prozentzahl des Acetonextraktes ist fast dieselbe wie die der Rinde, an ungesättigten Phosphatiden ist es reicher, an gesättigten ärmer als die Rinde.

Das Rückenmark des Rindes ist unvergleichlich wasserärmer als sein Gehirn; die Trockensubstanz des Rückenmarkes besteht zu $^4/_5$ aus Lipoiden, während die Lipoide des Gehirns nur $^3/_5$ seiner Trockensubstanz ausmachen. Die Acetonextrakte beider differieren nicht bedeutend, der Petrolätherextrakt des Rückenmarkes ist fast doppelt so groß als der des Gehirns,

umgekehrt enthält das Gehirn prozentuell fünfmal so viel gesättigte Lipoide als das Rückenmark.

Es wird nun zunächst unsere Aufgabe sein, durch eine große Serie von Untersuchungen des Menschenhirns die physiologischen Grenzwerte für Wasser- und Lipoidgehalt des Gesamthirns und seiner Abschnitte festzustellen; es wird weiter nötig sein, nicht bei der Bestimmung der einzelnen Extrakte stehen zu bleiben, sondern diese, Schritt haltend mit der Erkenntnis der chemischen Zusammensetzung der einzelnen Phosphatide, in ihre Bestandteile zu zerlegen und letztere quantitativ zu bestimmen. Wie verschieden dieselben Extrakte verschiedener Gehirnabschnitte zusammengesetzt sind, geht aus folgendem Beispiel hervor:

Der Petrolätherextrakt der weißen Substanz enthält . . . 48% Kephalin.
„ „ „ Brücke und des verlängerten Markes enthält 30 „ „
„ „ „ Rinde enthält nur . . . . . 23 „ „

Erst wenn durch eine genügende Anzahl von Untersuchungen die normalen Verhältnisse geklärt sein werden, wird es sich empfehlen, zur Untersuchung pathologischer Gehirne überzugehen.

Quantitativ chemische Untersuchungen des Gehirns sind bisher nur in geringer Zahl ausgeführt. Die Befunde Petrowskys[1]), der noch der Anschauung war, daß der Ätherextrakt des Gehirns Fette enthalte, haben wohl nur historisches Interesse.

De Regibus[2]), Bourgoin[3]) und Forster[4]) bestimmten nur den Wassergehalt des menschlichen Gesamthirns, der grauen und weißen Substanz, und fanden Werte, die

für das Gesamthirn zwischen 78,78% und 80,93%
„ die graue Substanz „ 83,0 „ „ 87,64 „
„ „ weiße „ „ 69,15 „ „ 73,50 „

schwankten.

Thudichum[5]) hat das Verhältnis von Kephalin, Lecithin und Cholesterin zur feuchten Hirnsubstanz festgestellt,

[1]) Pflügers Arch. 7.
[2]) Atti de la Reg. Acad. di Med. di Torino 1884.
[3]) Rech. chim. sur le cerveau, Paris 1866.
[4]) Beitr. z. Biol., Festschr. Bischoff, Stuttgart 1882.
[5]) Die chemische Konstitution des Gehirns d. Menschen u. d. Tiere, Tübingen 1901.

Tabelle in %.

	Wassergehalt	Trockensubstz.	Gesamtlipoide		Acetonextrakt			Petroläther-extrakt			Summe der gesätt. Lipoide	Benzolextrakt			Absol. alkohol. Extrakt			Verd. alkohol. Extrakt		
			Ausgangsmaterial	Trockensubstanz	Ausgangsmaterial	Trockensubstanz	Gesamtlipoide	Ausgangsmaterial	Trockensubstanz	Gesamtlipoide		Ausgangsmaterial	Trockensubstanz	Gesamtlipoide	Ausgangsmaterial	Trockensubstanz	Gesamtlipoide	Ausgangsmaterial	Trockensubstanz	Gesamtlipoide
Kaninchen	81,00	19,00	10,43	54,98	2,33	12,31	22,25	4,70	29,77	44,72	33,02	2,68	14,16	25,57	0,58	3,04	5,50	0,20	1,08	1,95
Katze	77,72	22,28	12,13	54,43	3,63	16,29	29,94	5,07	22,75	41,80	28,09	2,15	9,63	17,69	0,89	4,02	7,38	0,39	1,75	3,21
Hund	83,52	16,48	9,17	55,63	2,23	13,55	24,36	4,44	26,98	48,49	27,14	1,76	10,72	19,27	0,58	3,50	6,30	0,14	0,87	1,57
Schwein	76,91	23,09	14,45	62,62	3,25	14,07	22,48	5,95	25,77	41,16	36,37	3,62	15,67	25,02	1,26	5,46	8,72	0,38	1,65	2,63
Kalb	81,10	18,90	10,67	56,40	1,87	9,87	17,50	5,51	29,16	51,69	30,80	1,88	9,95	17,65	1,15	6,09	10,79	0,25	1,33	2,36
Rind	77,44	22,56	13,37	59,23	4,39	19,44	32,83	4,71	20,88	35,26	31,92	3,16	14,02	23,67	1,00	4,43	7,48	0,10	0,45	0,77
Pferd	71,25	28,75	19,32	61,84	5,89	18,87	30,52	7,23	23,16	37,45	32,03	4,35	13,92	22,50	1,62	5,19	8,39	0,22	0,71	1,14
Affe (Macacus)	77,66	22,34	14,60	50,88	1,96	8,78	17,26	6,01	26,91	52,86	29,86	2,07	9,27	18,22	1,15	5,05	9,93	0,15	0,87	1,71
Kind (6 Mon.)	79,85	20,15	8,64	42,77	2,09	10,37	24,24	3,52	17,46	40,81	34,94	2,06	10,21	23,85	0,83	4,14	9,67	0,12	0,61	1,42
Mensch: Gesamthirn des Erwachsenen	76,10	23,90	14,79	61,33	3,52	14,64	23,87	6,94	28,85	47,04	29,08	2,95	12,27	20,00	1,07	4,46	7,27	0,27	1,11	1,81
Wesentlich Rinde	81,99	18,01	9,90	54,95	1,59	8,84	16,09	4,86	27,00	49,12	34,76	2,10	11,68	21,25	1,00	5,53	10,07	0,34	1,89	3,44
Rinde, ganz rein	83,62	16,38	7,50	45,82	1,87	11,44	24,96	2,12	12,98	28,32	46,70	1,52	9,27	20,23	1,71	10,43	22,76	0,28	1,70	3,71
Weiße Substanz	67,61	32,39	22,43	69,24	3,20	9,92	14,33	14,37	44,37	64,07	21,61	3,74	11,55	16,69	0,97	3,00	4,33	0,13	0,40	0,59
„ „ ganz rein	70,18	29,82	22,31	74,80	5,59	18,74	25,05	10,01	33,57	44,87	30,11	5,33	17,87	23,90	1,27	4,25	5,69	0,11	0,38	0,52
Brücke u. verläng. Mark	72,50	27,50	17,63	64,10	4,07	14,81	23,10	7,06	25,68	40,05	36,83	5,25	19,11	29,81	0,94	3,41	5,31	0,30	1,09	1,71
Brücke u. verläng. Mark	72,63	27,37	19,95	72,91	3,47	12,70	17,42	10,88	39,78	54,56	28,03	4,27	15,61	21,41	1,04	3,82	5,25	0,27	1,00	1,37
Kleinhirn	76,17	23,83	10,59	44,43	2,97	12,47	28,08	3,43	14,39	32,39	39,51	2,67	11,23	25,26	1,21	5,08	11,44	0,29	1,25	2,81
„	80,81	19,19	9,05	47,15	2,14	11,17	23,69	3,27	17,02	36,11	40,21	2,03	10,58	22,44	1,40	7,30	15,49	0,20	1,07	2,28
Rind, Rückenmark	66,23	33,77	26,71	79,09	7,79	23,08	29,18	17,21	50,97	64,45	6,88	1,19	3,51	4,44	0,42	1,24	1,57	0,10	0,29	0,37

S. Fränkel[1]) hat aus 100 kg Menschenhirn die Durchschnittswerte für Wasser und Lipoide in derselben Weise wie wir berechnet und gefunden:

Trockensubstanz	23%
Aus der Trockensubstanz beträgt der	
Acetonextrakt	20,60%
Petrolätherextrakt	27,836%
Benzolextrakt	13,53 „
Alkohol „	6,256 „
Äther „	0,916 „

Noll[2]) bestimmte den Wasser- und Protagongehalt vom Menschen- und Ochsenhirn und einzelner Abschnitte desselben, ferner des Nervus ischiadicus des Pferdes.

W. Koch und S. A. Mann[3]) stellten fest, daß mit dem Wachstum des Menschenhirns eine Abnahme des Wassergehaltes, der Proteine, der Extraktivstoffe und der Asche, aber eine Zunahme der Ceribrine, des Lipoidschwefels und des Cholesterins einhergehe.

Von Bibras Untersuchungen gingen dahin, festzustellen, wie viel das Gehirn oder Teile des Gehirns vom Menschen und Tieren an Wasser, Ätherextrakt und festem Rückstand enthalten.

M. Cohn[4]) schließt aus seinen Untersuchungen über Kalk-, Phosphor- und Stickstoffgehalt von 13 Kinderhirnen, daß das Gehirnwachstum jenseits des 1. Lebensjahres sich mehr durch Ansatz N-freier als durch Zunahme N-haltiger Substanz vollziehe.

Methodik.

Gehirnbrei wird im Trockenkasten zur Konstanz getrocknet und zunächst der Wassergehalt bestimmt, oder der Gehirnbrei wird in Aceton gebracht, der wässerige Aceton nach einiger Zeit abfiltriert und nun mit warmem Aceton erschöpfend extrahiert. Der kalte und warme Acetonextrakt werden zusammengewogen. Die gesamte Trockensubstanz oder ein aliquoter Teil derselben wird dann im Soxhletapparat der Reihe nach warm mit Aceton, niedrig siedendem Petroläther, Benzol und ab-

[1]) Diese Zeitschr. 19, 254.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 370.
[3]) Journ. of Physiol. 36, proc. XXXVI.
[4]) Deutsche med. Wochenschr., Nov. 1907, H. 48.

solutem Alkohol erschöpfend extrahiert und zum Schluß mit 80%igem Alkohol ausgekocht. Aus den einzelnen Extrakten wird das Lösungsmittel entweder abdestilliert oder einfach verjagt, der Rückstand zur Konstanz getrocknet und das Gewicht desselben in ein prozentuelles Verhältnis zum Gewicht des Ausgangsmaterials, der Trockensubstanz und der Gesamtlipoide gebracht.

Aceton nimmt das gesamte Cholesterin und neben anderen noch nicht genügend studierten Substanzen ein ungesättigtes, mit Cadmium fällbares Phosphatid auf, das für den Aufbau der Gehirnrinde von wesentlicher Bedeutung ist; in den Petroläther gehen neben geringen Mengen eines Sphingogalaktosids die ungesättigten Phosphatide über, nämlich Kephalin, Myelin und das letzthin von uns[1]) beschriebene, vom Lecithin des Ochsenhirns abweichende Sahidin.

Benzol, absoluter und verdünnter Alkohol sind die Lösungsmittel für die gesättigten Lipoide, also für die Sphingogalaktoside, das Sphingomyelin, die Sulfatide und einige noch unbekannte Körper.

Die Trennung derselben durch die für die Extraktion der gesättigten Gruppe angewandten Lösungsmittel ist leider keine exakte, so daß wir uns veranlaßt sehen, eine Rubrik für die Gesamtmenge der mit Benzol, absolutem und verdünntem Alkohol extrahierten gesättigten Lipoide aufzustellen.

Wir sind daran, Lösungsmittel ausfindig zu machen, welche die gesonderte Extraktion der einzelnen chemischen Individuen aus dem Gehirn ermöglichen.

[1]) Diese Zeitschr. 24, 268.

Über Lipoide.

Von

Sigmund Fränkel.

XII. Mitteilung.

Über die Phosphatide des Pferdepankreas.

Von

Th. R. Offer.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung, Wien.)

(*Eingegangen am 14. April 1910.*)

Es wurde schon mehrfach von uns darauf hingewiesen, daß nicht nur die Phosphatide der verschiedenen Organe untereinander verschieden sind, sondern daß auch ein und dasselbe Organ bei verschiedenen Tierarten sich verschieden verhält, indem es verschieden gebaute Phosphatide beherbergt. So haben S. Fränkel und G. A. Pari (diese Zeitschr. 17, 68, 1909) gezeigt, daß im Rinderpankreas ein Vesaltin genanntes Monaminomonophosphatid vorkommt, aber keine gesättigten Phosphatide, wie sie, wie wir gefunden haben, im Pferdepankreas vorkommen. Wir haben beobachtet, daß im Rinder- und im Pferdepankreas verschiedene Phosphatide vorkommen, und teilen im folgenden unsere Ermittelungen mit.

$4^1/_2$ kg ganz frisches, vom Fett sorgfältig durch Präparation befreites Pferdepankreas wurden nach dem Zermahlen in der Fleischmaschine mit viel Aceton kalt digeriert, dann wurde filtriert, das gehärtete Organ scharf abgepreßt und mit heißem Aceton der Preßkuchen erschöpfend in einem großen Soxhletapparat extrahiert. Dieser heiß bereitete acetonige Extrakt wurde durch Destillation von Aceton befreit; der Rückstand scheidet beim Erkalten eine krystallinische Masse aus. Die

Krystalle wurden von dem flüssigen Fett abfiltriert, mit 90% Alkohol gewaschen und zwischen Filtrierpapier abgepreßt. Der Krystallbrei wurde aus heißem absolutem Alkohol bis zur Konstanz des Schmelzpunktes umkrystallisiert. Aus den $4^1/_2$ kg feuchten Organs erhielten wir eine Ausbeute von 2 g. Die Substanz schmilzt bei 120°; krystallisiert in Nadeln. Die Analysen ergaben folgende Resultate:

0,1328 g Substanz gaben 0,3371 g CO_2, d. i. 69,23% C
und 0,1397 g H_2O, d. i. 11,77% H,
0,1794 g Substanz gaben 0,4558 g CO_2, d. i. 69,29% C
und 0,1893 g H_2O, d. i. 11,81% H.

Die N-Bestimmung nach Dumas ergab:

0,1850 g Substanz gaben V. 3,47, T. 22, B. 750, d. i. 2,142% N,
0,1542 g „ „ V. 2,95, T. 22, B. 755, d. i. 2,199% N.

Die P-Bestimmung nach Liebig ausgeführt und nach Woy gefällt, ergab:

0,1021 g Substanz gaben 0,0091 $Mg_2P_2O_7$, d. i. 2,48% P.

Diese Werte ergeben folgende Formel für die Substanz:

$$C_{72}H_{147}N_2PO_{11}.$$

Zusammenstellung der analytischen Resultate auf obige Formel berechnet:

	Gefunden		Durchschnitt	Berechnet für $C_{72}H_{147}N_2PO_{11}$
C	69,23	69,29	69,26	69,34
H	11,77	11,81	11,79	11,79
N	2,14	2,199	2,17	2,24
P	2,48		2,48	2,48
O			14,3	14,15

Dieses Diaminomonophosphatid aus dem Pferdepankreas ist ein gesättigtes Phosphatid. Leider standen uns keine größeren Mengen zur Verfügung, um näheres über seine Zusammensetzung zu ermitteln.

Neben diesem gesättigten Phosphatid, das im Rinderpankreas nicht vorkommt, fanden wir auch ungesättigte Phosphatide, die mit dem von S. Fränkel und G. A. Pari[1]) beschriebenen Vesaltin nicht identisch sind. Wir sind eben mit dem Studium dieser Substanzen weiter beschäftigt.

[1]) l. c.

Über alimentäre Gesetzmäßigkeiten der Acetonurie.

Von

G. Ascoli und L. Preti.

(Aus dem Institut für spezielle Pathologie innerer Krankheiten der Kgl. Universität Pavia.)

(Eingegangen am 15. April 1910.)

Mit 2 Figuren im Text.

Die vorliegenden Untersuchungen streben die Feststellung etwaiger quantitativer Gesetzmäßigkeiten der Acetonurie an.

Es ist in dieser Hinsicht nur bekannt, daß infolge der Entziehung der Kohlenhydrate eine Ausscheidung von Acetonkörpern in Erscheinung tritt, die durch Darreichung größerer Mengen von Kohlenhydraten, aber auch durch Zulagen von Eiweiß und einer Reihe anderer chemisch sehr verschiedenartiger Stoffe — antiketogene Substanzen — eingeschränkt oder behoben werden kann.

Die näheren Angaben weichen aber untereinander wesentlich ab. Die zur Unterdrückung der Acetonkörper erforderlichen Zulagen werden — soweit überhaupt näher bestimmt — außerordentlich verschieden eingeschätzt. Die Ausschaltung der Kohlenhydrate wird bald als eine an sich genügende Bedingung für die Hervorrufung auch starker Acetonausscheidung angesprochen; bald wird eine solche bereits als Ausdruck gleichzeitig ausgesprochener Unterernährung oder geringer Eiweißzufuhr aufgefaßt.

Die Einstellung der Acetonausscheidung ist entsprechend einigen Angaben bei annähernd gleicher Diät zwar individuell verschieden, wird aber dauernd und gleichmäßig festgehalten; nach anderer Erfahrung stellt sie hingegen eine in jeder Hinsicht schwankende und vorübergehende Erscheinung dar, die

ohne Änderung der Diät durch eine Art Anpassung des Organismus behoben wird.

Diese aus der zusammenfassenden Erfahrung hervorgehende scheinbare Unregelmäßigkeit der Erscheinung beeinträchtigt wesentlich ihre physiologische Auffassung und die Beurteilung der pathologischen Verhältnisse. Sie legt daher die bestimmte Untersuchung nach dem Bestande quantitativer Gesetzmäßigkeiten des physiologisch-chemischen Vorganges nahe.

Durch die zurzeit gegebenen Beobachtungen wird diese grundsätzliche Frage kaum beleuchtet.

Die Tierversuche liefern schon wegen des vom Menschen allzusehr abweichenden Verhaltens der Tiere betreffs der Acetonausscheidung keinen Beitrag. Die Erfahrungen am Menschen aber erstrecken sich — um von ihren scheinbaren Widersprüchen ganz abzusehen — über im allgemeinen kurze, diätetisch wenig variierte Zeiträume und ergänzen einander wegen der unerklärt beträchtlichen individuellen Schwankungen nur sehr unvollkommen.[1])

Die im Selbstversuche erhobene längere Reihe,[2]) die wir hier mitteilen, stellt eben die Schwierigkeit der Verwertung nicht durchaus paralleler oder aufs eingehendste verfolgter Beobachtungen in scharfes Licht.

Der Verlauf der Kurve 1 (S. 58), die den Versuch wiedergibt, ist zwar in seinen großen Zügen ein fast überraschend regelmäßiger. Die Perioden, in die der Versuch zerfällt, sind ohne weiteres durch scharf ausgeprägte Schwankungen gekennzeichnet. Immerhin bleibt aber auch innerhalb der einzelnen Perioden der Betrag der von den Mittelwerten abweichenden Ausschläge ganz beträchtlich und erreicht Werte, die den absoluten Mengen der berücksichtigten Stoffe gegenüber bereits schwer ins Gewicht fallen.

---

[1]) Die kurz angedeuteten Lücken der einschlägigen Forschung sind im Handb. d. Pathol. d. Stoffw. von C. v. Noorden (1907), im Handb. d. Biochemie 4, 1. Hälfte (1909) von Oppenheimer, in dem Referat von Magnus-Levy (Ergebn. d. inn. Med. 1908) ausführlich behandelt worden. Wir glauben daher in dieser tatsächlichen Mitteilung auf breitere literarische Hinweise zum Vorteil der Kürze besser zu verzichten.

[2]) Zur Technik erwähnen wir: Aceton nach Messinger-Huppert; meist Doppelbestimmungen; β-Oxybuttersäure nach Bergell, berechnet nach der Drehungskonstante $-24{,}12°$; Stickstoff nach Kjeldahl.

Das Verbleiben bei gleichen Versuchsbedingungen bringt diese sekundären Schwankungen nicht regelmäßig zum Schwinden; irgendeine Periodizität oder Regelmäßigkeit drückt sich in ihnen nicht merklich aus.

Dasselbe Verhalten weisen auch die Mittelwerte weiter auseinander liegender Perioden auf, in denen — wie unsere Kurve zeigt — ziemlich gleichwertige Acetonzahlen merklich abweichenden Diätbedingungen ohne sonstige auffällige Verschiebung der Lebensgewohnheiten entsprechen können.

Man kann also bei der Beurteilung mäßiger Ausschläge und beim Vergleich unabhängiger Reihen kaum vorsichtig genug sein. Damit ist aber keineswegs gesagt, daß die Aufstellung quantitativer Gesetzmäßigkeiten bei der Acetonurie als den Tatsachen nicht entsprechend zu unterbleiben habe. Im Gegenteil scheinen uns solche in den Hauptwellen unserer Kurve einen deutlichen Ausdruck zu finden.

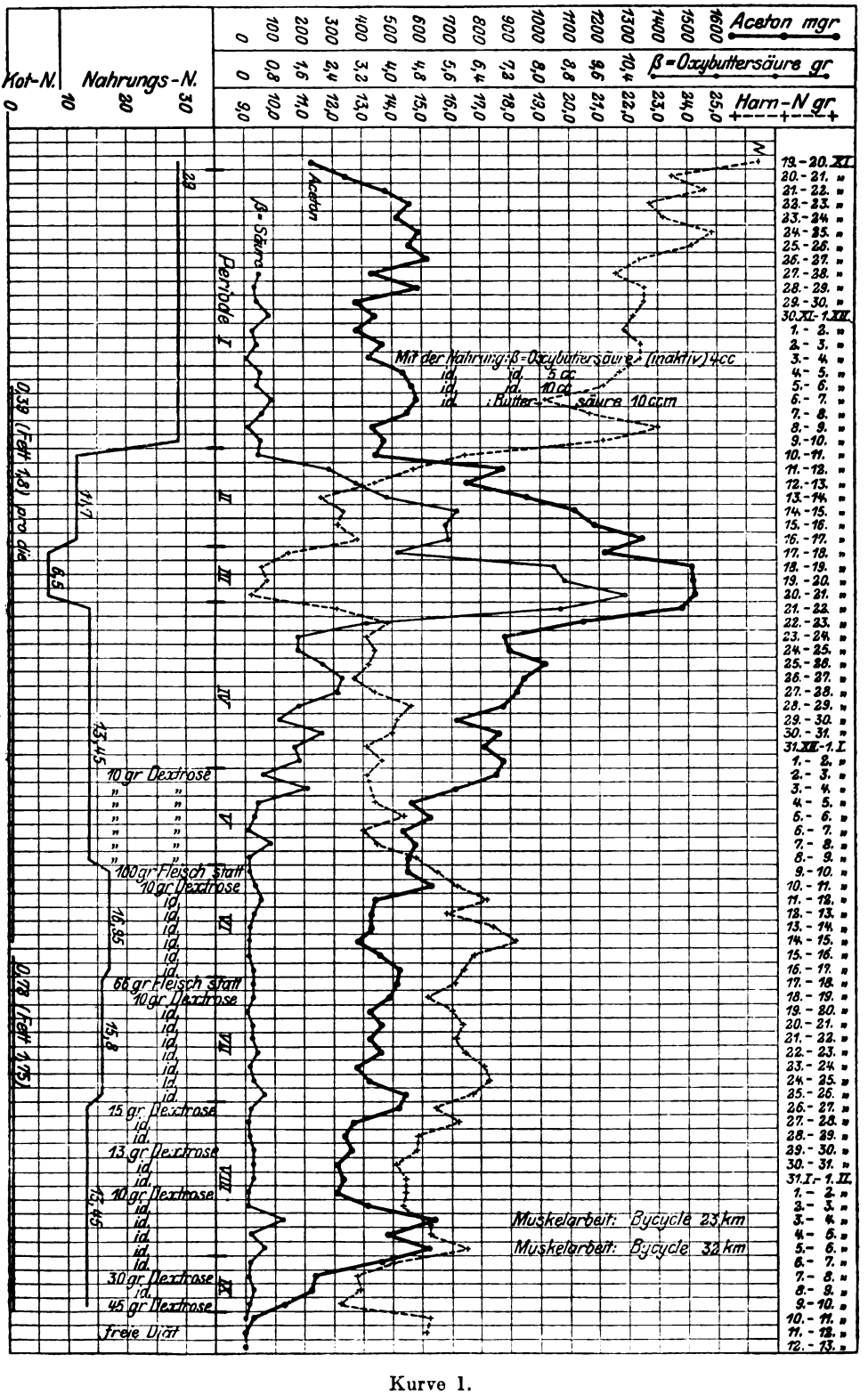
Diese Hauptwellen entsprechen wesentlich qualitativen Verschiebungen in der Zusammensetzung der Diät. Die Lebensgewohnheiten und Beschäftigungen[1]), der durchaus befriedigende Gesundheitszustand blieben während der ganzen Beobachtungsperiode annähernd dieselben; der quantitativ-calorische Wert der Diät wurde anfänglich mit ziemlicher,[2]) später mit nahezu absoluter Genauigkeit auf das vorausbestimmte Niveau (ca. 33 Cal. pro Kilogramm) eingestellt und bei Änderung der Nahrung durch entsprechende Verschiebung der Bestandteile festgehalten (s. Anhang).

Es beleuchtet somit die Beobachtung im großen und ganzen einen etwa 3monatlichen Zeitraum geringer Unterernährung und gleichmäßiger Calorienbilanz, während dessen die Acetonurie bei Stickstoffgleichgewicht wie bei geringem Ansatz, und bei angedeutetem bis ziemlich schwerem Verlust, bei mäßiger wie bei reichlicher Zufuhr von Nahrungsfett, bei absoluter und leicht ein-

---

[1]) Mäßig anstrengende Berufs- und Lehrtätigkeit neben Laboratoriumsarbeit.

[2]) Anfänglich wurden die in üblicher Weise zubereiteten Speisen auf der Schnellwage zugewogen; später wurde die Diät in einfachster Weise zusammengestellt und vor der Zubereitung die einzelnen Bestandteile gewogen. Die Zusammensetzung der Nahrungsmittel wurde besonders kontrolliert. Als Zuckerersatz: Saccharin (s. Anhang).


Aceton mgr
ß-Oxybuttersäure gr
Harn-N gr
Kot-N.
Nahrungs-N.
Aceton
ß-Säure
Periode I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
IX
Mit der Nahrung: ß-Oxybuttersäure (inaktiv) 4cc
id. 5cc
id. 10cc
id. Buttersäure 10cc m
0,39 (Fett 1,8) pro die
0,78 (Fett 1,75)
10 gr Dextrose
100 gr Fleisch Stalf
66 gr Fleisch Stalf
15 gr Dextrose
13 gr Dextrose
10 gr Dextrose
30 gr Dextrose
45 gr Dextrose
freie Diät
Muskelarbeit: Bycycle 23 km
Muskelarbeit: Bycycle 32 km

Kurve 1.

geschränkter, abgestufter Kohlenhydratkarenz unter möglichster Ausdehnung der einzelnen Perioden zur Erzielung von Gleichgewichtszuständen verfolgt wurde. Die leichte Unterernährung[1]) — die von einzelnen als ein Mangel des Versuchs empfunden werden könnte — wurde im Voranschlag der Diät festgelegt, um ihre Einhaltung sicherer zu gewährleisten; tatsächlich wären die strengeren Fettperioden ohne diese Vorsicht kaum erreichbar gewesen, da schon die gegebenen Fettmengen nach der vorgängigen Fleisch-Fettdiät nur widerwillig vertragen wurden und zu einer Abkürzung der schärfsten Diät nötigten.

Von Anfang bis zu Ende der langen Beobachtungsperiode hat der Organismus die gesetzten abnormen Ernährungsbedingungen mit der entsprechenden Abweichung des Stoffwechsels beantwortet; von einer allmählichen Anpassung war er beim Abschluß des Versuchs noch so weit entfernt, daß selbst ganz wesentliche Gaben von Kohlenhydraten zur vollständigen Löschung der Acetonurie unzureichend sich erwiesen: dazu waren noch immer die großen Überschüsse erforderlich, die man nach alter Erfahrung zur Unterdrückung der alimentären Acetonurien kürzerer Dauer benötigt.

Die Kohlenhydratbeschränkung oder -entziehung hat aber während dieser ganzen Zeit, von der Auslösung der Erscheinung abgesehen, auf deren Verlauf und Ausmaß durchaus keinen besonders hervorragenden Einfluß ausgeübt; denn während diesbezüglich, wie betreffs der Calorienbilanz und der individuellen Besonderheiten, die Verhältnisse ganz oder nahezu unverändert blieben, ließ sich die Acetonurie durch qualitative Änderung der Diät und andere Eingriffe willkürlich auf verschiedene Höhe einstellen und um Werte verschieben, die die Ausgangszahlen und die Breite der selbständigen Schwankungen jenseits jeder Fehlergrenze bis zu mehreren Vielfachen übersteigen.

Der Grundzug dieser Beziehung zwischen Diät und Acetonkörpern springt in die Augen: wie die Beschränkung der Kohlenhydrate die Acetonausscheidung auslöst, so schraubt die fortschreitende Streichung der Eiweißkörper mit entsprechendem Eintritt von Fett (s. Diättabelle) ihren Wert zu sonst unerreichbarer Höhe hinauf. Dabei fällt dem Ausfall der Eiweiß-

[1]) Der Gewichtsverlust (s. Anhang) wurde nach Abbruch des Versuchs in 12 Tagen vollständig ersetzt.

körper gegenüber der Fettzulage wohl die entscheidende Rolle zu: denn sonst lösen auch ganz beträchtliche Zulagen niederer Fettsäuren keine ähnlich ausgesprochene zweifellose Wirkung aus.

Die quantitative Wirkung der Eiweißkörper ist eine sehr ausgesprochene. In der hier mitgeteilten Beobachtung folgen auf äußerste Abweichungen von über 100 g in der Zufuhr, etwa 70 g im Umsatz des Eiweißes (vgl. Per. I und III; auch Per. III und IV) entgegengesetzte Ausschläge von 10 bis 11 g in der Ausscheidung der Acetonkörper (Gesamtwert von Aceton und β-Oxybuttersäure, als Oxybuttersäure berechnet).

Nun ist zwar allgemein anerkannt, daß Eiweiß in großen Mengen eine Acetonurie zu verhindern oder zu unterdrücken vermag. Die angeführten Zahlen weisen aber den Eiweißkörpern eine viel wesentlichere Rolle in der Regelung der einschlägigen Vorgänge zu. Der Vergleich dieser ziffernmäßig bestimmten Wirkung mit dem Sparerfolg von 10 g Dextrose, durch welche die Acetonkörper um 1,6 bis 1,8 g herabgedrückt werden, ergibt nämlich, daß Eiweiß und Zucker sich einander gegebenenfalls nahe im Verhältnis ihres Gewichts vertreten (0,7 bis 0,8 : 1). (Per. IV, V.)

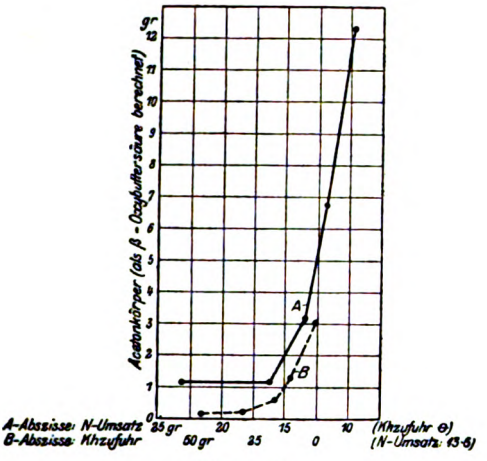
Eine durchgängig gleichwertige und gleichmäßige Vertretung findet aber immerhin nicht statt.

Die Erfahrung, daß beim Versuche eines gegenseitigen Ersatzes die Sparwirkung von 14 bis 22 g Eiweiß sich ungefähr zwischen jene von 10 bis 15 g Dextrose einstellt, ist mangels der undurchführbaren Mitbestimmung der Acetonausscheidung durch die Lungen nicht eindeutig: die etwas schwankende, scheinbar aber nicht vollgültige Vertretung mag ja durch ungleichmäßige Abdunstung durch die Lungen verwischt sein. (Per. V—VIII.)

Der Vergleich entfernterer Perioden lehrt uns aber mit großer Bestimmtheit, daß bei gleicher Calorienbilanz und Individualität die Beziehung des Eiweißumsatzes zur Acetonurie doch keine durchaus feste und unverrückbare ist.

Die Sparwirkung des Eiweißes wie die des Zuckers steht zur verabreichten oder umgesetzten Menge nicht in einfach geradem Verhältnisse. Sie wird mit der Annäherung an die vollständige Entziehung oder größtmögliche Einschränkung immer ausgesprochener und steigt bei gleichmäßig fortschreitender Streichung steiler und steiler an. Bei hohem Eiweißumsatz bleibt

die Sparwirkung des Eiweißes hinter jener des Zuckers wesentlich zurück, erreicht und übersteigt dieselbe aber bei wachsender Eiweißkarenz (s. Kurve 2).



Kurve 2.

A-Kurve: Acetonkörper bei Kh-Karenz und fallendem N-Umsatz.
B-Kurve: Acetonkörper bei festem N-Umsatz und fallender Kh-Zulage.

Die im Mittel dem aufs Gewicht bezogenen Sparwerte des Zuckers nahestehende Wirkung des Eiweißes kann sich also innerhalb weiterer Grenzen verschieden hoch einstellen.

Diese Erfahrung wird durch die Erwägung befriedigend verständlich, daß der Abbau des Eiweißes je nach Art und Umständen in verschiedener Weise und auf verschiedenen Wegen erfolgt, und gewährt uns einen Einblick in die Ursachen der selbständigen Schwankungen der Acetonurie, betreffs der hier besonders vermerkt werden mag, daß sie, entsprechend neueren Angaben von Forßner[1]), zum Teil sicherlich (vgl. Periode VIII) auf verschiedener Arbeitsleistung an verschiedenen Tagen beruhen.

* * *

Es geht somit aus den angeführten Tatsachen hervor, daß zwar die Beschränkung der Nahrungskohlenhydrate eine zur Auslösung einer Acetonurie entsprechende, an sich aber ungenügende Bedingung darstellt: immer ist eine gleichzeitige Einschränkung des Eiweißumsatzes zum Zustandekommen der Wirkung unerläßlich.

[1]) Skand. Arch. f. Physiol. 22, 1909.

Nach Eintritt einer Acetonurie durch gleichzeitige entsprechende Einstellung der Eiweiß- und Kohlenhydratzufuhr bestimmt sich deren Ausmaß nach dem Grade der Beschränkung des einen wie des anderen Nahrungsbestandteils; hochgradige Acetonurie läßt sich nur durch stärkste Schmälerung des Nahrungseiweißes bei Ausschluß der Kohlenhydrate erzielen.

Die Acetonkörperausscheidung verläuft der Nahrungs-Eiweiß- und Kohlenhydratkurve mit gegen die Höchstwerte stark zunehmender Steilheit entgegengesetzt (Kurve 2).

Der gegensätzliche Verlauf ist trotz nicht unwesentlicher Schwankungen (Kurve 1), die auf dem ketogenen Einfluß der Muskelarbeit, auf verschiedenem Abbau und antiketogener Verwertung des Eiweißes und anderen Nebenumständen beruhen, bei genügender Änderung der Beobachtungsbedingungen scharf ausgesprochen.

Eintritt und Austritt von Eiweiß wie von Kohlenhydraten in der Diät haben veränderte Einstellung der Acetonkörperwerte zur Folge; gleiche Gewichtsmengen Zucker und Eiweiß haben — abgesehen von der innerhalb gewisser Grenzen schwankenden Wertigkeit des Eiweißes — annähernd gleiche Wirkung.

Die hier zusammengestellten Sätze erläutern den Ablauf der alimentären Acetonurie unter den einfachsten Bedingungen. Wir vermögen aus ihnen keinerlei Ausnahmestellung der Kohlenhydrate in der Auslösung und Bestimmung der Acetonurie abzuleiten. Die hervorragende Rolle der Kohlenhydrate in der Kost der Kulturvölker, das reichliche Ausmaß, in dem sie zur Deckung des Energiebedarfs herangezogen werden, die Leichtigkeit und Häufigkeit ihrer Einschränkung und Ausschaltung in Ausnahmezuständen erklären die verhältnismäßig frühe scharfe Erfassung ihrer klar zutage liegenden Beziehung zur Acetonkörperausscheidung.

Die nähere Betrachtung ergibt aber zwischen der Wirkung der Eiweißkörper und der Kohlenhydrate eine weitgehende Übereinstimmung und rückt zugunsten der im Vordergrund stehenden Bedeutung des Eiweißes die Tatsache in helles Licht, daß zum Eintritt hochgradiger Acetonkörperausscheidung die Eiweißkarenz nicht entbehrt werden kann.

Das Eiweiß wirkt auf die Acetonurie durch einen fakultativ veränderlichen chemischen Vorgang ein, der es nahe dem Zucker gleichwertig ausnützt; ob dies auf dem Wege einer weitgehenden

physiologischen Zuckerbildung aus Eiweiß geschieht, ist aber — wenn auch die gegenseitige Ergänzung der Kurven des Sparwertes von Zucker und Eiweiß dafür einzutreten scheint (Kurve 2) — eine aus dem heutigen Tatbestande heraus noch unlösbare Frage.

Protokollauszüge.

I. Diättabellen.

22. XI. 09. Butter 58 g, Rindsbraten 220 g, Räucherzunge 140 g; Thunfisch eingelegt 25 g, Salm ger. 35 g, Käse 80 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

23. XI. 09. Butter 57 g, Rindfleisch gesotten 65 g, Kalbsbraten 130 g, Fischmayonnaise 100 g, Zunge 70 g, Schinken 25 g, Sardinen eingelegt 50 g, Käse 110 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

24. XI. 09. Butter 70 g, Rindfleisch ges. 70 g, Rindsbraten 210 g, Fischmayonnaise 65 g, Zunge 105 g, Käse 80 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

25. XI. 09. Butter 60 g, Rindsbraten 125 g, Rindfleisch ges. 85 g; Zunge 72 g, Schinken 22 g, Scholle 75 g, Fischmayonnaise 55 g, Käse 70 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

26. XI. 09. Butter 75 g, Rindsbraten 220 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 60 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N ca. 28,8 g. Fett ca. 130,9 g. Cal. 1984.

27. XI. 09. Butter 50 g, Rindsbraten 110 g, Rindfleisch 105 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 60 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N ca. 28,8 g. Fett ca. 109,80 g. Cal. 1788.

28. XI. 09. Butter 93 g, Rindsbraten 110 g, Kalbsbraten 110 g, Zunge 100 g, Sardinen 105 g, Käse 75 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N ca. 28,5 g. Fett ca. 148,8 g. Cal. 2162.

29. XI. 09. Butter 87 g, Rindsbraten 160 g, Kalbsbraten 60 g, Zunge 100 g, Sardinen 107 g, Käse 68 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N ca. 28,3 g. Fett ca. 141,45 g. Cal. 2069.

30. XI. 09. Butter 100 g, Rindsbraten 110 g, Rindfleisch 105 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 75 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N ca. 29,25 g. Fett ca. 156,53 g. Cal. 2234.

1. XII. 09. Butter 65 g, Rindsbraten 220 g, Zunge 100 g, Sardinen 110 g, Käse 62 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N ca. 29,25 g. Fett ca. 121,91 g. Cal. 1913.

2. XII. 09. Butter 100 g, Rindsbraten 110 g, Rindfleisch 110 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 75 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N ca. 29,55 g. Fett ca. 156,58 g. Cal. 2243.

3. XII. 09. Butter 93 g, Rindsbraten 110 g, Rindfleisch 110 g, Zunge 100 g, Sardinen 117 g, Käse 80 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N 29,75 g. Fett 151,85 g. Cal. 2204.

4. XII. 09. Butter 100 g, Rindsbraten 220 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 65 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.

N 28,95 g. Fett 153,57 g. Cal. 2199.

5. XII. 09. Butter 100 g, Rindsbraten 110 g, Kalbsbraten 110 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 75 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee
N 29,25 g. Fett 156,43 g. Cal. 2233.

6. XII. 09. Butter 93 g, Rindsbraten 110 g, Rindfleisch 110 g. Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 67 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.
N 29,35 g. Fett 148,25 g. Cal. 2160.

7. XII. 09. Butter 100 g, Rindsbraten 220 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 70 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.
N 29,15 g. Fett 155,08 g. Cal. 2218.

8. XII. 09. Butter 100 g, Rindsbraten 110 g, Rindfleisch 110 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 75 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee,
N 29,55 g. Fett 156,58 g. Cal. 2243.

9. XII. 09. Butter 100 g, Rindsbraten 220 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 75 g, 4 Eier, 300 ccm Bouillon, Tee.
N 29,25 g. Fett 156,59 g. Cal. 2235.

10. XII. 09. Butter 160 g, Zunge 100 g, Sardinen 120 g, Käse 70 g 300 ccm Bouillon, Tee.
N 11,71 g. Fett 184,85 g. Cal. 2031.

11. XII. 09. Butter 180 g, sonst wie oben.
N 11,71 g. Fett 201,73 g. Cal. 2188.

12. XII. 09. Wie 11.
N 11,71 g. Fett 201,73 g.

13. XII. 09. Wie 11.
N 11,71 g. Fett 201,73 g.

14. XII. 09. Butter 165 g, sonst wie 11.
N 11,71 g. Fett 189,07 g. Cal. 2070.

15. XII. 09. Butter 146 g, sonst wie 11.
N 11,71 g. Fett 173,03 g. Cal. 1921.

16. XII. 09. Butter 155 g, sonst wie 11.
N 11,71 g. Fett 180,63 g. Cal. 1991.

17. XII. 09. Butter 180 g, Zunge 100 g, Käse 70 g, 300 ccm Bouillon, Tee.
N 6,45 g. Fett 188,21 g. Cal. 1921.

18. XII. 09. Wie 17.
N 6,45 g. Fett 188,21 g.

19. XII. 09. Wie 17.
N 6,45 g. Fett 188,21 g.

20. XII. 09. Butter 168 g, sonst wie 17.
N 6,45 g. Fett 178,08 g. Cal. 1827.

21. XII. 09. Butter 150 g, Rindfleisch 100 g, Kalbfleisch 100 g, Zunge 100 g, Käse 70 g, 300 ccm Bouillon, Tee.
N 13,45 g. Fett 165,49 g. Cal. 1897.

22. XII. 09 bis 1. I. 10. Wie 21. XII. 09.

2. I. 10. Butter 150 g, Rindfleisch 100 g, Kalbfleisch 100 g, Zunge 100 g, Käse 70 g, 300 ccm Bouillon, Tee, Dextrose 10 g.
N 13,45 g. Fett 165,49 g. Cal. 1939.

3. I. bis 8. I. 10. Wie 2. I.

9. I. 10. Butter 150 g, Rindfleisch 150 g, Kalbfleisch 150 g, Zunge 100 g, Käse 70 g, 300 ccm Bouillon, Tee.
N 16,95 g. Fett 166,79 g. Cal. 1972.
10. I. bis 16. I. 10. Wie 9. I.
17. I. 10. Butter 150 g, Rindfleisch 133 g, Kalbfleisch 133 g, Zunge 100 g, Käse 70 g, 300 ccm Bouillon, Tee.
N 15,80 g. Fett 166,34 g. Cal. 1967.
18. 1. bis 25. I. 10. Wie 17. I.
26. I. 10. Butter 150 g, Rindfleisch 100 g, Kalbfleisch 100 g, Zunge 100 g, Käse 70 g, 300 ccm Bouillon, Tee, Dextrose 15 g.
N 13,45 g. Fett 165,49 g. Cal. 1860.
27. I. bis 28. I. 10. Wie 26. I.
29. I. bis 31. I. 10. Dextrose 13 g, sonst unverändert.
Cal. 1852.
1. II. bis 5. II. 10. Dextrose 10 g, sonst unverändert.
Cal. 1840.
6. II. bis 8. II. 10. Dextrose 30 g, Butter 140 g, sonst unverändert.
N 13,45 g. Fett 114,86 g. Cal. 1951.
9. II. 10. Dextrose 45 g, Butter 135 g, sonst unverändert.
N 13,45 g. Fett 110,64 g. Cal. 1976.
10. II. 10. Freie Diät.

II. Nahrungsanalysen:

Braten	N 6,5%	Fett nicht best.
Rindfleisch gesotten	N 6,8%	„ „ „
Sardinen	N 4,2%	„ 22,2%
Zunge	N 3,55%	„ 12,15%
Käse	N 2,8%	„ 22,2%
Eier (nach Mittelgewicht)	N 0,8 p. St.	
Bouillon	N 0,3%	

Die nicht besonders bestimmten Werte wurden nach König eingestellt.

III. Anfangsgewicht 62,500 kg

11. XII.	58,250 „
17. XII.	58,000 „
21. XII.	57,000 „
31. XII.	57,000 „
6. I.	56,400 „
12. I.	55,500 „
19. I.	55,200 „
28. I.	54,500 „
9. II.	54,300 „

Betreffs der Acetonkörper usw. verweisen wir, zum Vorteil der Kürze, auf die Kurve 1.

Zur Biologie der Phagocyten. VII.

Einfluß von Ca-Ionen auf die Chemotaxis.

Von

H. J. Hamburger.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Groningen, Niederlande.)

(Eingegangen am 15. April 1910.)

Einleitung und Versuchsverfahren.

Bis jetzt wurde nachgewiesen, daß durch Hinzufügung geringer Ca-Mengen zum Serum oder zu einer NaCl-Lösung die Phagocytose in hohem Maße befördert wird.[1])

Diese Versuche wurden alle in vitro vorgenommen. Es war nun von Interesse, zu erforschen, ob auch im lebenden Körper ein anregender Einfluß von Calcium auf die Bewegung der Phagocyten zu konstatieren sein würde. Zu diesem Zweck haben wir den Einfluß von Ca auf die Chemotaxis in Angriff genommen. Und wie ich bei einer anderen Gelegenheit nebenbei bereits bemerken konnte, wurde in der Tat ein fördernder Einfluß von Ca auf die Chemotaxis konstatiert.[2]) Kurze Zeit nachher habe ich einiges über die betreffenden Versuche berichtet.[3]) Die vorliegende Arbeit enthält eine Fortsetzung dieser Studien. Sie gibt zu gleicher Zeit eine Antwort auf eine Frage, die von anderer Seite anläßlich unserer Phagocytose-Untersuchungen erhoben wurde.

In der Zeitschrift für Balneologie vom 15. Agust 1909 liest man nämlich, daß auf Veranlassung des Kgl. preuß. Mi-

---

[1]) Hamburger u. Hekma, Zur Biologie der Phagocyten. III. Mitteilung. Diese Zeitschr. 9, 275, 1908.

[2]) H. J. Hamburger, Over de Permeabiliteit van roode bloedlichaampjes voor Ca-Ionen. Zittingsverslag der Kon. Acad. v. Wetenschappen, Amsterdam, 27, Maart 1909.

[3]) H. J. Hamburger, Über den Einfluß von Ca-Ionen auf die Chemotaxis. Archivio di Fisiologia 7, 81, 1909. Dedicato a Giulio Fano. (Anfang April 1909 bei der Redaktion eingegangen.)

nisteriums der geistlichen, Unterrichts- und Medizinalangelegenheiten die folgende Frage an das Kais. Gesundheitsamt gestellt war:

„Ist ein Mineralwasser, das eine isotonische Kochsalzlösung darstellt, durch einen Gehalt von 0,1% Chlorcalcium gemäß den Untersuchungen des Prof. Hamburger in Groningen geeignet, dem Körper Stoffe zuzuführen, die in dem Serum die Aufgabe haben, den Verdauungsprozeß der Bakterien vorzubereiten, die Phagocytose erheblich zu steigern? Sind einschlägige Untersuchungen in staatlichen Instituten mit einem Mineralwasser, das jene chemischen Vorbedingungen erfüllt, zu empfehlen?"

Herr Prof. Dr. H. Kionka (Jena) hat darüber am 29. April ein in genannter Zeitschriftnummer abgedrucktes Referat erstattet, in dem derartige Untersuchungen als höchst wünschenswert erachtet werden.

Mit Hinsicht auf das von balneologischer Seite dieser Angelegenheit entgegengebrachte Interesse habe ich dann auch mit dem Wasser der Virchowquelle, Kiedrich bei Eltville (Wiesbaden), das bekanntlich eine bedeutende Calciummenge enthält, einige Versuchsreihen angestellt.

Es wurde nach zwei Methoden gearbeitet. Die erste Methode bestand darin, daß kleine, an einem Ende zugeschmolzene Capillarröhrchen, die gefüllt waren mit einer Suspension von B. coli commune in $CaCl_2$-haltiger und nicht $CaCl_2$-enthaltender 0,9%iger NaCl-Lösung, unter die Haut von Kaninchen gebracht wurden und nach einiger Zeit ermittelt wurde, wie groß die eingedrungenen Leukocytensäulchen waren. Die zweite Methode bestand darin, daß wir einigen Kaninchen $CaCl_2$ in den Darmkanal einverleibten, andere im normalen Zustande beließen und dann untersuchten, inwieweit die mit Coli-Kultur beschickten Capillarröhrchen bei den ersten Kaninchen eine größere Phagocytensäule angelockt hatten als bei den zweiten.

An einer andern Stelle haben wir, wie soeben gesagt, einige Ergebnisse genannter Untersuchungen, die in der Tat einen kräftigen fördernden Einfluß geringer Calciummengen auch auf die Chemotaxis aufwiesen, beschrieben.

Bei der Fortsetzung dieser Untersuchungen kamen wir auf den Gedanken, daß vielleicht die in den Capillarröhrchen vorhandenen Bakterien als solche die erhaltenen Zahlen beeinflußt haben könnten; denn bei der mikroskopischen Untersuchung der in die Röhrchen eingedrungenen Phagocyten waren bei weitem die meisten auseinander gefallen, offenbar durch die giftige Wirkung der Bakterien, mit denen sie sich strotzend gefüllt hatten.

So habe ich denn die Versuche wiederholt mit Flüssigkeiten, in denen die Bakterien verweilt hatten, aber aus denen sie nachher entweder durch Zentrifugieren oder durch Filtration durch eine Chamberland-Kerze entfernt waren. Es sei bereits jetzt mitgeteilt, daß die Resultate mit den früher erhaltenen vollkommen übereinstimmten. Nur waren hier, wo bakterienfreie Flüssigkeiten in den Capillarröhrchen gebraucht wurden, die Säulen länger als da, wo wie früher auch Bakterien vorhanden waren. Es ist das wohl erklärlich, wenn man bedenkt, daß in den bakterienfreien Flüssigkeiten die Leukocyten nicht auseinander fielen und durch ihre Lebenstätigkeit weiter kriechen konnten.

Bevor ich zu der Beschreibung der Versuchsresultate übergehe, will ich vorher noch einiges über das Versuchsverfahren mitteilen. Für die Experimente wurden, wie gesagt, Kaninchen benutzt.

Die Methode ist in der Hauptsache dieselbe, die wir früher gelegentlich einer Untersuchung über den Einfluß venöser Stauung auf die Chemotaxis beschrieben haben.[1])

Was die Ausführung der Methode betrifft, sei zunächst bemerkt, daß beim Kaninchen am besten die Innenfläche der Hinterpfoten benutzt wird. Schneidet man da die Haut des Oberschenkels ein, so läßt sich mit Hilfe der stumpfen Seite des Skalpells in sehr leichter Weise ein Raum für die Röhrchen präparieren, ohne daß irgend eine Blutung auftritt. Bei Hunden kann man letztere nicht umgehen, und das steht einem zuverlässigen Experimentieren mit diesen Tieren in nicht geringem Maße im Wege.

Um die Glasröhrchen, die eine Länge von 1 bis $1^1/_2$ cm besitzen, so unter die Haut zu legen, daß man ein Zerbrechen nicht zu befürchten hat und um dieselben weiter unter möglichst gleiche Bedingungen zu bringen, werden dieselben in ein parallelepipedonförmiges und von sehr

[1]) Hamburger, Virchows Archiv 156, 329, 1899; Osmotischer Druck und Ionenlehre in den medizinischen Wissenschaften 1, 414.

feinen parallelen Kanälchen versehenes Korkstückchen geschoben, aus denen dann die freien Enden des Capillares etwa $1^1/_2$ mm hinausragen. Das in dieser Weise mit Capillaren beschickte Korkstück wird tief in die Hauttasche geschoben und die Wunde dicht genäht, um einige Stunden nachher zur Hinausbeförderung der Röhrchen wieder geöffnet zu werden.

Die Anfertigung der Capillaren erfolgt, indem in einer fächerförmigen Bunsenschen Flamme ein langes Capillarrohr gezogen wird. Die lichte Weite der gebrauchten Capillaren schwankte um 0,3 mm. Taucht man dasselbe in die Suspension ein, so steigt diese von selbst auf. Dann hält man die Capillare horizontal und schmilzt in einer sehr kleinen Flamme eins der beiden Enden zu, nachdem man durch Schiefhaltung die Suspension an dieser Stelle ein wenig hat zurückfließen lassen. Nun legt man das Rohr horizontal und macht, indem man die Volarseite des ersten Vorderfingergliedes als Stützfläche gebraucht, einen feinen Feilstrich auf der Capillare und bricht ab.

In dieser Weise hat man dann ein an einem Ende zugeschmolzenes und am anderen Ende offenes und mit Suspension gefülltes Capillarröhrchen bekommen. Am zugeschmolzenen Ende wird wohl immer noch ein wenig Luft zurückgeblieben sein. Die Menge soll aber möglichst gering sein, sonst zieht sich beim Abkühlen die Flüssigkeits- oder Suspensionssäule zurück, und am offenen Ende ist Luft statt Flüssigkeit vorhanden. Dies ist nun auf jeden Fall zu vermeiden. Denn das Eindringen von Leukocyten erfolgt nur dann, wenn die Bakterienprodukte in die Umgebung der Röhrchen diffundieren können, und das ist ausgeschlossen, wenn das Capillarröhrchen am offenen Ende nicht vollständig gefüllt ist. Aus diesem Gesichtspunkt empfiehlt es sich auch, das Korkparallelepipedon vorn an der Seite der offenen Enden zuzuspitzen. Dadurch wird die Bedingung für die Kontinuität zwischen Capillarröhrcheninhalt und Gewebeflüssigkeit verbessert.

Jetzt ist das Röhrchen fertig, um in das Korkstückchen geschoben zu werden. Um ein zweites Röhrchen anzufertigen, schmilzt man wieder das eine Ende des langen Capillarrohres zu, bricht ab usf.

Die Messung der Säulchen erfolgt, indem man dieselben auf einen Streifen Millimeterpapier legt, das auf einer Platte von schwarzem Glase aufgeklebt ist. Die Platte wird auf den Objekttisch eines Präpariermikroskopes gelegt; bei 8maliger Vergrößerung werden die Säulchen gemessen. Oft wird auch eine Lupe genügen.

A. Versuche mit Ca-haltenden Bakterienaufschwemmungen und Kulturen.

(Erste Methode.)

Nachdem die Colibakterien 3 Stunden mit 0,9%iger NaCl-Lösung in Berührung gewesen sind, werden dieselben zentrifugiert, und die klare Flüssigkeit wird abgehoben. Von dieser wird ein Teil als solcher, d. h. ohne weiteren Zusatz, gebraucht;

ein anderer Teil wird mit 0,01% $CaCl_2$ versetzt. Mit beiden Flüssigkeiten werden je 3 Capillarröhrchen beschickt. Nachdem dieselben in 2 Korkstückchen gesteckt sind, werden sie in eine Hauttasche geschoben.

Versuch 1.

	Rechte Pfote	Linke Pfote
	Extrakt v. Colibakterien in 0,9% NaCl	Extr. v. Colibakterien in NaCl 0,9% + 0,01% $CaCl_2$
Summe v. je 3 Leukocytensäulchen nach 24 St. .	4,25 mm	4,75 mm

Man sieht, daß eine Zugabe von 0,01% $CaCl_2$ zum Bakterienextrakt die Chemotaxis befördert hat.

Die folgenden Versuche bezwecken, zu erforschen, inwieweit die Menge des hinzugefügten $CaCl_2$ die Größe der Chemotaxisbeförderung beeinflußt.

Versuch 2.

	Linke Pfote	Rechte Pfote
	Extrakt v. Colibakterien + 0,05% $CaCl_2$	Extrakt v. Colibakterien + 0,075% $CaCl_2$
Summe v. 3 Leukocytensäulchen nach 24 St. .	3,25 mm	4,5 mm

In Übereinstimmung mit dem ersten Versuchsresultat ergibt sich, daß eine Zugabe von 0,075% $CaCl_2$ zum Bakterienextrakt eine größere Chemotaxis herbeiführt als eine Zugabe von 0,05%.

Versuch 3.

	Linke Pfote	Rechte Pfote
	Extrakt v. Colibakterien + 0,05% $CaCl_2$	Extrakt v. Colibakterien + 0,1% $CaCl_2$
Summe v. 3 Leukocytensäulchen nach 24 St. .	2,25 mm	2,75 mm

Aus diesem Versuche erhellt, daß durch Hinzufügung von 0,1% $CaCl_2$ zwar die Chemotaxis größer ist als nach Zugabe von 0,05%, aber der Unterschied ist nicht bedeutend.

Dasselbe Resultat, obgleich mehr im quantitativen Sinne ausgesprochen, liefert folgender Versuch.

Versuch 4.

	Linke Pfote	Rechte Pfote
	Extrakt v. Colibakterien + 0,075% $CaCl_2$	Extrakt v. Colibakterien + 0,1% $CaCl_2$
Summe v. 3 Leukocytensäulchen nach 24 St. .	2 mm	3,5 mm

Die oben erwähnten Versuche lassen keinen Zweifel, daß beim Vermischen von mikrobenfreiem Bakterienextrakt mit $CaCl_2$ das Eindringen von Leukocyten, also die Chemotaxis, befördert wird. Man sieht also, daß nicht nur in Bakteriensuspensionen, sondern auch in von Bakterien befreiten Extrakten, Calcium die Chemotaxis anregt.

Was den Mechanismus des Eindringens von Leukocyten in die Capillarröhrchen betrifft, so hat man sich vorzustellen, daß die in den Capillarröhrchen vorhandenen, in der NaCl-Lösung gelösten Bakterienprodukte, die Phagocyten, die am offenen Ende erscheinen, zum Fortschreiten in das Röhrchen veranlassen. Ist die Flüssigkeit phagocytenfrei geworden, so werden die soeben eingedrungenen Phagocyten durch neue ersetzt. Nun ist es wohl verständlich, daß Momente, welche die amöboide Bewegung der Zellen beschleunigen, auch ein schnelleres Fortschreiten zur Folge haben müssen, m. a. W. eine größere Zellensäule hervorbringen werden.

B. Versuche mit Einverleibung von Ca enthaltenden Lösungen in den Darmkanal.

(Zweite Methode.)

1. Ca-haltende NaCl-Lösung.

Diese Methode unterschied sich nur darin von der ersten, daß wir nicht das Bakterienextrakt, sondern die Gewebsflüssigkeit mit Calcium beschickten. Es wurde das dadurch erzielt, daß wir dem Kaninchen Calcium einverleibten. Am bequemsten konnte das durch rectale Einspritzung von Ca-haltenden Flüssigkeiten erfolgen. Um dem vorzubeugen, daß die eingespritzte Lösung nicht etwa von im Rectum vorhandenen Faeces absorbiert wurde, entfernten wir dieselben vor der Injektion, anfänglich mittels eines Klysmas von Kochsalzlösung, bald aber, nachdem es sich herausstellte, daß später dünne Fäkalmassen nachkamen,

einfach durch sanften Druck auf den Bauch. Die Kaninchen erhielten 4mal pro Tag 15 ccm Flüssigkeit, also im ganzen 60 ccm pro Tag.

Die in das Rectum einverleibten Flüssigkeiten waren:

1. 60 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung (zur Kontrolle)
2. 60 „ „ „ + 0,1 g $CaCl_2$
3. 60 „ „ „ + 0,2 g „
4. 60 „ „ „ + 0,5 g „

Die jetzt folgenden Versuchsreihen dienten dazu, zu erforschen:

1. ob nach Einverleibung von $CaCl_2$ eine Beförderung der Chemotaxis zu beobachten sein würde, wenn nicht, wie früher, eine unfiltrierte Bakterienkultur sich in den Capillarröhrchen befand, sondern eine filtrierte, d. h. von Bakterien befreite;

2. inwieweit die Menge des einverleibten Calciums die Größe der Chemotaxis beeinflußte.

Es wurden für diese Experimente 2mal 4 Kaninchen gebraucht. Bezeichnen wir die Kaninchen der ersten Reihe mit 1, 3, 5 und 7 und die der zweiten mit 2, 4, 6 und 8. Jedes Tier bekommt 3 Capillarröhrchen in die Hauttasche einer der beiden Hinterpfoten. Die Röhrchen bleiben 24 Stunden liegen; dann wird die Länge der Säulchen in der oben angegebenen Weise gemessen.

Versuchsreihe 5.

	Rectal einverleibte Flüssigkeit	Länge der 3 Leukocytensäulchen
Kaninchen 1	60 ccm 0,9%ige NaCl-Lsg.	3,5 mm
„ 3	60 „ „ „ + 0,1 g $CaCl_2$	8,6 „
„ 5	60 „ „ „ + 0,2 g „	5,5 „
„ 7	60 „ „ „ + 0,5 g „	7 „

Aus diesen Versuchsergebnissen erhellt:

1. daß alle NaCl-Lösungen, die $CaCl_2$ enthalten, nach Einverleibung in den Darmkanal eine größere Chemotaxis hervorgerufen haben als die reine NaCl-Lösung;

2. daß die Beförderung der Chemotaxis nicht nur zum Ausdruck kommt gegenüber Kulturen als solchen, wie wir früher bereits fanden,[1]) sondern auch gegenüber den Stoffwechselprodukten der Bakterien (filtrierte Kulturen von B. coli);

[1]) Festschrift f. Prof. Fáno, l. c.

3. daß bei steigender $CaCl_2$-Zugabe die Chemotaxis nicht in denselben Verhältnissen zunimmt.

Versuchsreihe 6.

Diese Versuchsreihe enthält eine Wiederholung der vorigen. Es wurden hier 4 andere Kaninchen gebraucht, nämlich 2, 4, 6 und 8, und außerdem wurden bei jedem Tiere die beiden Hinterpfoten mit je 3 Capillarröhrchen mit filtrierter Kultur beschickt.

	Rectal einverleibte Flüssigkeit	Länge der 6 Leukocytensäulchen
Kaninchen 2	60 ccm 0,9%ige NaCl-Lsg.	5 mm
„ 4	60 „ „ „ +0,1 g $CaCl_2$	9,5 „
„ 6	60 „ „ „ +0,2 g „	9 „
„ 8	60 „ „ „ +0,5 g „	9,30 „

Wir haben hier ein ähnliches Resultat zu verzeichnen wie in der vorigen Versuchsreihe:

1. sieht man, daß auch hier die Chemotaxis gegenüber Stoffwechselprodukten der Bakterien in erheblichem Maße durch Zugabe von $CaCl_2$ befördert wird;

2. daß eine Zugabe von mehr als 0,1 g $CaCl_2$ keine weitere Steigerung der Chemotaxis herbeigeführt hat.

Wir stellten uns nun die weitere Frage, ob auch bei Fortsetzung des Versuches, d. h. nach dem Einbringen neuer Capillarröhrchen, unter Fortsetzung der Einspritzung von $CaCl_2$, die Erscheinung sich wiederholen würde.

Es wurden also dieselben 8 Kaninchen der vorigen Versuchsreihen gebraucht, und zwar wieder so, daß beim Kaninchen 1, 3, 5, 7, die eine bereits benutzte Hauttasche und bei 2, 4, 6, 8 die beiden Hauttaschen gebraucht wurden.

Versuchsreihe 7.

	Rectal einverleibte Flüssigkeit	Länge der 3 Leukocytensäulchen
Kaninchen 1	60 ccm 0,9%ige NaCl-Lsg.	3 mm
„ 3	60 „ „ „ +0,1 g $CaCl_2$	5 „
„ 5	60 „ „ „ +0,2 g „	4,5 „
„ 7	60 „ „ „ +0,5 g „	5,5 „

Wie ersichtlich, stimmt das Resultat mit dem vom Versuch 5 überein, nur sind hier alle Zahlen für die Chemotaxis kleiner. Übrigens sieht man, daß Kaninchen 3 ebenso wie im Versuch 5 eine relativ große Chemotaxis aufweist. Es handelt sich hier offenbar um eine individuelle Eigenschaft.

Jetzt folgt das Experiment mit den anderen Kaninchen:

Versuchsreihe 8.

	Rectal einverleibte Flüssigkeit	Länge der 6 Leukocytensäulchen
Kaninchen 2	60 ccm 0,9%ige NaCl-Lsg.	4,5 mm
„ 4	60 „ „ „ + 0,1 g $CaCl_2$	8,7 „
„ 6	60 „ „ „ + 0,2 g „	10,5 „
„ 8	60 „ „ „ + 0,5 g „	8 „

Auch hier stellt sich heraus, daß bei Fortsetzung des Versuches, also am 2. Tage, das Calcium einen fördernden Einfluß auf die Chemotaxis ausgeübt hat.

Auf eine weitere Fortsetzung des Versuches an einem 3. Tage mußte verzichtet werden, weil derselbe mit Rücksicht auf die Wunde nicht mehr ganz einwandfrei auszuführen war.

Schließlich noch ein paar vergleichende Versuche über den Einfluß des Filtrierens der Kultur auf die Größe der Chemotaxis.

Zu diesem Zweck haben wir bei den Kaninchen 1, 3, 5, 7 eine Pfote mit filtrierter und die andere gleichzeitig mit unfiltrierter Colikultur beschickt.

Versuchsreihe 9.

Einfluß der Filtration der Kultur auf die Größe der Chemotaxis.

	Flüssigkeiten	Länge der Leukocytensäulchen	
		filtrierte Kultur (vgl. Versuch 5)	nicht filtrierte Kultur
Kaninchen 1	0,9%ige NaCl-Lsg.	3,5 mm	2,25 mm
„ 3	„ „ + 0,1 g $CaCl_2$	8,6 „	5 „
„ 5	„ „ + 0,2 g „	5,5 „	3,25 „
„ 7	„ „ + 0,5 g „	7 „	4,5 „

Man sieht, daß bei Anwendung der filtrierten Kulturen die Säulchen größer sind als bei der nicht filtrierten. Der Grund dieser Erscheinung ist nach dem, was wir bei mikroskopischer Untersuchung des Inhalts der Röhrchen gesehen haben, höchst wahrscheinlich darin zu suchen, daß bei den nicht filtrierten durch Aufnahme von Bakterien eine sehr große Zahl Phagocyten zugrunde gegangen sind. Indessen dokumentiert sich, in Übereinstimmung mit dem, was wir auch früher konstatieren konnten, auch bei der nicht filtrierten Kultur wieder ein deutlicher Einfluß von Ca auf die Chemotaxis.

Dieselben Kaninchen geben am 2. Tag ein ähnliches Resultat.

Versuchsreihe 10.

	Flüssigkeiten	Länge der Leukocytensäulchen	
		filtr. Kultur (vgl. Vers. 7)	nicht filtr. Kultur
Kaninchen 1	0,9%ige NaCl-Lösung	3 mm	2 mm
„ 3	0,9 „ „ + 0,1 g $CaCl_2$	5 „	3,75 „
„ 5	0,9 „ „ + 0,2 g „	4,5 „	3,25 „
„ 7	0,9 „ „ + 0,5 g „	5,5 „	3,5 „

Man ersieht also, daß auch bei Fortsetzung des Versuches die filtrierte Kultur eine größere Chemotaxis herbeiführt als die unfiltrierte.

Für Versuche über Chemotaxis ist demnach eine filtrierte Colikultur einer unfiltrierten vorzuziehen.

2. Ca-reiches Mineralwasser. (Virchowquelle.)

Es wurde hier in vollkommen gleicher Weise experimentiert wie bei den Versuchen über den Einfluß von $CaCl_2$-haltiger NaCl-Lösung.

Zunächst sollte berechnet werden, wieviel von dem Mineralwasser einverleibt werden mußte.

Nach der Analyse von H. Fresenius enthält 1 l des Wassers außer einigen Bestandteilen in geringeren Quantitäten:

NaCl . . . 6,82 g.	$CaSO_4$ . . . 0,12 g.
KCl . . . . 0,38 „	$CaHCO_3$ . . 0,25 „
LiCl . . . 0,06 „	$MgCO_3$ . . 0,13 „
$CaCl_2$ . . . 0,98 „	CO_2 . . . . 0,18 „

Der Ca-Gehalt ist also sehr bedeutend; das Mineralwasser enthält nahezu 0,1% $CaCl_2$.

Nun haben wir bei den Versuchen mit $CaCl_2$-haltigen NaCl-Lösungen 0,1, 0,2 und 0,5 g $CaCl_2$ pro Tag verabreicht. Dementsprechend hätten wir den Kaninchen 100, 200 und 500 ccm des Mineralwassers pro Tag einverleiben müssen. Diese Volumina sind aber ziemlich groß. Andererseits aber wird den Menschen pro Tag im Mittel 1 l des Wassers vorgeschrieben. Rechnet man nun das Gewicht des Menschen auf 65 kg und das der von uns gebrauchten Kaninchen auf 3,5 kg, so würden dementsprechend die Kaninchen etwa erhalten müssen $\frac{3,5}{65} \cdot 100 = 54$ ccm. So haben wir denn den Tieren 60 ccm pro Tag

in 4 Malen verabreicht, also jedesmal 15 ccm. Sie erhielten demnach pro Tag 0,06 g $CaCl_2$.

Die jetzt folgenden Versuche 11, 12 und 13 wurden alle mit nicht filtrierter Kultur von B. coli in Bouillon ausgeführt.

Versuch 11. (Unfiltrierte Kultur.)

Ein Kaninchen bekommt während 3 Tagen jeden Tag 60 ccm Wasser der Virchowquelle und ein anderes für die Kontrolle die gleiche Menge einer 0,9%igen Kochsalzlösung. Dann werden Capillarröhrchen mit einer nicht filtrierten Kultur von B. coli in Bouillon unter die Haut der beiden Hinterpfoten gebracht und nach 24 Stunden entfernt. Auf dem Versuchstag hat keine Einverleibung von Salzlösung stattgefunden.

Resultat: Die Gesamtlänge der 6 Leukocytensäulchen beträgt
beim NaCl-Kaninchen . . . . . 7,25 mm,
„ Virchowquelle-Kaninchen . . . 9 „

Versuch 12. (Unfiltrierte Kultur.)

Diese Versuchsreihe ist eine Fortsetzung der vorigen bei denselben Tieren. Nur werden jetzt, während die Röhrchen unter der Haut liegen, also am Versuchstag, die beiden Flüssigkeiten (Kochsalzlösung und Mineralwasser) einverleibt.

Resultat: Die Gesamtlänge der 6 Leukocytensäulchen beträgt beim NaCl-Kaninchen . . . . . 8,4 mm,
„ Virchow-Quelle-Kaninchen 12 „

Versuch 13. Unfiltrierte Kultur.
Wiederholung von Versuch 11.

2 andere Kaninchen werden während 4 Tagen mit Wasser der Virchowquelle und 0,9%iger NaCl-Lösung vorbehandelt. Dann werden wieder Kulturen unter die Haut gebracht. Am Versuchstag werden keine Lösungen einverleibt.

Resultat: beim NaCl-Kaninchen . . . . . 6,5 mm,
„ Virchowquelle-Kaninchen . 7,75 „

Aus diesen 3 Versuchspaaren geht hervor, daß das Wasser der Virchowquelle die Chemotaxis in erheblichem Maße befördert hat. Bereits beim Hervorholen der Korkstückchen aus den Hauttaschen fiel es auf, daß der weiße Phagocytenbelag, der sich um die Korkstückchen und um die Capillarröhrchen gebildet hatte, bei den Virchowquelle-Kaninchen immer viel konsistenter, viel pha-

gocytenreicher war als bei den NaCl-Kaninchen. Das gleiche haben wir auch immer bei der rectalen Einverleibung von Ca-haltiger und Ca-freier NaCl-Lösung konstatieren können. Bei der Ca-haltigen Lösung war immer die weiße Masse viel dicker und phagocytenreicher.

Die nunmehr folgenden Versuche wurden mit bakterienfreien Coli-Kulturen, also lediglich mit den Stoffwechselprodukten angestellt.

Versuch 14.

Vorliegender Versuch ist, wie gesagt, nicht mit der unfiltrierten Kultur von B. coli, sondern bloß mit dessen Stoffwechselprodukten ausgeführt worden.

Diese wurden auf 2 Weisen erhalten:

1. Indem den Bakterien die Gelegenheit geboten wurde, sich in der Nährflüssigkeit (Glucosebouillon) zu entwickeln; dann wurden dieselben durch eine Chamberland-Kerze filtriert.

2. Indem von einer Plattenkultur auf Gelatinagar der weiße Belag entfernt wurde, mit NaCl-Lösung geschüttelt und die Suspension nach einiger Zeit ebenfalls durch eine Kerze filtriert wurde.

Mit Hinsicht auf weitere Experimente wünschten wir zu wissen, welche von beiden Flüssigkeiten die ausgiebigste Chemotaxis hervorrief. Zu diesem Zweck wurde bei einem und demselben Tiere die eine Pfote mit 3 Capillarröhrchen der ersten Bereitung und die andere mit 3 Capillarröhrchen der anderen Bereitung beschickt.

Dieses Versuchspaar wurde zu gleicher Zeit an 2 Kaninchen ausgeführt. Die Resultate ließen keinen Zweifel übrig. Die bakterienfreie Bouillonkultur ergab im Mittel eine Säule von 1,35 mm und die bakterienfreie NaCl-Flüssigkeit dagegen eine Säule von 0,75 mm.

Also nahmen wir für die folgenden Versuche lediglich bakterienfreie Bouillonkultur.

Versuchsreihe 15.

Hierzu wurden 4 Kaninchen, 1, 2, 3 und 4[1]), gebraucht. 1 und 2 bekommen 60 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung, 3 und 4 60 ccm Wasser der Virchowquelle.

[1]) Es handelt sich hier um andere Kaninchen als die, welche oben für die Einverleibung von $CaCl_2$-haltigen NaCl-Lösungen gebraucht wurden, und auch mit 1, 2, 3, 4 usw. bezeichnet wurden.

Unmittelbar nachdem die Capillarröhrchen unter die Haut geschoben sind und die Wunde geschlossen ist, wird mit den rectalen Einspritzungen angefangen.

30 Stunden nachher werden die folgenden Resultate notiert:

	Gesamtlänge der Leukocytensäulchen
Kaninchen 1, behand. mit NaCl 0,9 %	5,5 mm
„ 2, „ „ „ 0,9 „	6,5 „
„ 3, „ „ Wasser d. Vq.	9 „
„ 4, „ „ „ „ „	9 „

Versuch 16.

Wiederholung von Versuch 15 mit 4 anderen Kaninchen, 5, 6, 7 und 8. Jetzt bleiben aber die Capillarröhrchen statt 24 Stunden 2mal 24 Stunden unter der Haut liegen.

	Gesamtlänge der Leukocytensäulchen
Kaninchen 5, behand. mit NaCl 0,9 %	13,75 mm
„ 6, „ „ „ 0,9 „	11,5 „
„ 7, „ „ Wasser d. Vq.	14 „
„ 8, „ „ „ „ „	17 „

Der Einfluß des Mineralwassers ist auch hier wieder ersichtlich, aber es zeigt sich doch, daß derselbe nach zweimal 24 Stunden nicht so deutlich ausgesprochen ist wie nach 24 Stunden. Das leuchtet auch ein, wenn man einen Augenblick den Bildungsmechanismus der Säulchen im Auge behält (vgl. S. 69). Es empfiehlt sich also bei vorliegenden Chemotaxisversuchen nicht, die Capillarröhrchen länger als 24 Stunden unter der Haut liegen zu lassen.

Versuch 17.

Vorliegendes Experiment erfolgte mit denselben Kaninchen (und wie immer, auch in derselben Hauttasche) wie beim Versuch 16, und zwar am folgenden Tag. Während die Einverleibung von Flüssigkeiten fortgesetzt wird, bleiben die Röhrchen 24 Stunden liegen.

	Gesamtlänge der Leukocytensäulchen
Kaninchen 5, behand. mit NaCl 0,9 %	6,5 mm
„ 6, „ „ „ 0,9 „	6 „
„ 7, „ „ Wasser d. Vq.	10,75 „
„ 8, „ „ „ „ „	8,25 „

Man sieht, daß auch hier wieder das Mineralwasser die Chemotaxis befördert hat.

Versuch 18.

Dieser Versuch ist eine Wiederholung der vorigen und bezweckt, zugleich zu untersuchen, inwieweit die erhaltenen Resultate von der Weite der Capillarröhrchen abhängig sind. Im vorliegenden Versuch waren dieselben sehr eng: die lichte Weite betrug 0,2 mm.

Es wurden wieder 4 Kaninchen genommen.

Versuch mit sehr engen Capillarröhrchen.

	Gesamtlänge der 6 Leukocytensäulchen
Kaninchen 9, behand. mit NaCl 0,9%	6,5 mm
„ 10, „ „ „ 0,9 „	6,25 „
„ 11, „ „ Wasser d. Vq.	8,5 „
„ 12, „ „ „ „ „	8 „

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß auch in sehr engen Capillarröhrchen die Chemotaxis sich durch das Mineralwasser gesteigert erweist. Im selben Sinne fiel der folgende Versuch aus, wo die Capillarröhrchen weiter waren, als wir sie bis jetzt gebraucht hatten, nämlich 0,45 mm.

Versuch 19.

Dieselben Kaninchen wie im Versuch 18. Die Capillarröhrchen liegen wieder 24 Stunden unter der Haut. Während dieser Zeit werden rectale Einspritzungen verabfolgt.

Die Capillarröhrchen sind weiter als normal (0,45 mm).

	Gesamtlänge der 6 Leukocytensäulchen
Kaninchen 9, behand. mit NaCl 0,9%	7,5 mm
„ 10, „ „ „ 0,9 „	7,5 „
„ 11. „ „ Wasser d. Vq.	11,75 „
„ 12, „ „ „ „ „	11 „

Aus dieser Versuchsreihe erhellt, daß auch bei Anwendung weiter Capillarröhrchen, die Einverleibung des Ca-reichen Mineralwassers eine bedeutende Steigerung der Chemotaxis hervorgerufen hat. Der Umfang der Steigerung beträgt hier:

$$\frac{(11{,}75 + 11) - (7{,}5 + 7{,}5)}{7{,}5 + 7{,}5} \cdot 100 = 51\,\%.$$

Es sei hier hervorgehoben, daß diese Zahl sowie im allgemeinen die anderen Zahlen, die nach der oben befolgten Methode die Steigerung der Chemotaxis ausdrücken, bloß einen relativen Wert, oder genauer gesagt, einen Minimumwert

der Zunahme ausdrücken. Denn was ist eigentlich der Fall? Wenn ein Säulchen Leukocyten in das Capillarröhrchen eingedrungen ist, so beeinträchtigt dieses den weiteren Eintritt der beweglichen Zellen, und zwar hauptsächlich dadurch, daß jetzt der flüssige Inhalt der Capillarröhrchen nicht frei in die Umgebung diffundieren kann. So ist es denn auch erklärlich, daß bei längerem Aufenthalt der Capillarröhrchen unter der Haut der Einfluß des Calciums stets weniger zum Ausdruck kommt. Man erinnere sich an Versuch 16, wo der Aufenthalt der Röhrchen 2mal 24 Stunden betrug. Aus diesem Gesichtspunkt wäre es empfehlenswert gewesen, die Röhrchen noch kürzere Zeit als 24 Stunden liegen zu lassen. In diesem Fall wäre der prozentische Unterschied zwischen den Leukocytensäulchen bei den normalen und bei den Calciumtieren zweifelsohne größer ausgefallen. Demgegenüber stand aber der technische Nachteil, daß die absolute Länge der Säulchen kleiner gewesen wäre und weniger leicht genau zu messen. Es liegt auf der Hand, daß dieselbe Bemerkung für die Resultate mit $CaCl_2$-haltiger und $CaCl_2$-freier NaCl-Lösung auch Gültigkeit besitzt.

Noch aus einem andern Grund dürfte in Wirklichkeit die Steigerung der Chemotaxis bei der Aufnahme des Mineralwassers größer sein, als dieselbe sich aus den Versuchen ergeben hat. Wird ja dasselbe unter normalen Umständen nicht auf rectalem Wege einverleibt, sondern per os. Dadurch wird das im Wasser vorhandene Calciumcarbonat und Hydrocarbonat im Magen in $CaCl_2$ umgewandelt, und es gelangt also mehr Calcium zur Resorption, als wenn man das Wasser per rectum einspritzt. Durch die Körperwärme nämlich wird Kohlensäure ausgeschieden und es fällt $CaCO_3$ aus.

Aus zwei Gründen also muß der fördernde Einfluß des Mineralwassers auf die Chemotaxis höher veranschlagt werden, als aus der erhaltenen Vergrößerung der Phagocytensäulchen hervorgeht; deshalb sind die erhaltenen Zahlen nur Minimalwerte.

Befördert das Wasser der Virchowquelle auch die Phagocytose?

Es schien interessant, zu untersuchen, ob das Ca-reiche Mineralwasser ebenso wie die Ca-haltige NaCl-Lösung die Kohle aufnehmende Tätigkeit der Phagocyten steigern würde.

Ich gebe hier 2 Versuchsreihen, aus denen dies deutlich hervorgeht.

Einfluß von Mineralwasser auf die Phagocytose.

Flüssigkeiten	Prozentgehalt der Leukocyten, die Kohle aufgenommen haben
NaCl 0,9%	$\frac{170}{315} \cdot 100 = 53{,}9\%$
Wasser der Virchowquelle	$\frac{150}{234} \cdot 100 = 64{,}1\%$

Wie ersichtlich, ist das phagocytäre Vermögen durch das Wasser der Virchowquelle erheblich, nämlich um

$$\frac{64{,}1 - 53{,}9}{53{,}9} \cdot 100 = \pm 20\%$$

gesteigert. Denn wie aus früheren Versuchen hervorgeht, ist in 0,9% NaCl das phagocytäre Vermögen nahezu dasselbe wie im Serum.

Eigentlich muß der befördernde Einfluß des Mineralwassers hier noch höher veranschlagt werden, zunächst da es ein wenig hypisotonisch ist, und zweitens, da bei Erwärmung auf Körpertemperatur der Ca-Gehalt abnimmt.

Daß in der Tat das Mineralwasser schwach hypisotonisch ist, dürfte aus Gefrierpunktsbestimmungen hervorgehen, die in meinem Laboratorium von Herrn Assistenten J. Offringa und von Prof. F. Bubanović unabhängig voneinander und zu verschiedenen Zeiten vorgenommen wurden.

Bekanntlich sind wir gewohnt, bei der Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung von Flüssigkeiten auch die einer 1%igen NaCl-Lösung anzuführen.[1])

NaCl 1% $\Delta = -0{,}640°$.	NaCl 1% $\Delta = -0{,}634°$.
Wasser d. Vq. $\Delta = -0{,}511°$.	Wasser d. Vq. $\Delta = -0{,}509°$.

Diese beiden ganz unabhängig voneinander ausgeführten Bestimmungen zeigen in der Tat eine sehr gute Übereinstimmung. Berechnet man, welcher NaCl-Lösung die Depression des Mineralwassers ungefähr entspricht, so bekommt man $\frac{0{,}560}{0{,}637} \cdot 1\% = 0{,}8\%$, das ist also gegenüber dem Blutserum ein

[1]) Osmotischer Druck und Ionenlehre 1, 455.

wenig hypisotonisch, was auch bereits aus der Vergleichung mit der Gefrierpunktserniedrigung des menschlichen Blutes, die im Mittel $-0{,}56°$ beträgt, hervorgeht.

Nun wurde früher beobachtet,[1]) daß in schwach hypisotonischen Lösungen die Phagocytose geringer ist als in isotonischen NaCl-Lösungen; und in wasserverdünntem Serum geringer als in normalem Serum. Wenn man aber bedenkt, daß bereits während der Resorption im Darmkanal anisotonische Salzlösungen isotonisch werden,[2]) so wird es einleuchten, daß die schwache Hypotonie des Mineralwassers bald in eine Isotonie übergehen wird.

Natürlich wird, wie wir bereits früher bemerkten und wie auch von Kionka[3]) hervorgehoben wurde, damit nicht gesagt, daß durch Verabreichung von Lösungen, die 0,1%iges $CaCl_2$ enthalten, der Calciumgehalt des Blutserums sich um 1% steigern wird; und selbst wenn dies der Fall wäre, so wäre es auch nicht gestattet anzunehmen, daß diese selbe Steigerung auch in der Gewebeflüssigkeit erfolgen werde. Und auf die Zusammensetzung der Lymphe kommt es doch bei örtlichen bakteriellen Prozessen gewöhnlich gerade an. Indessen lehren die obigen Untersuchungen, sowohl mit Calcium haltigen NaCl-Lösungen wie mit Wasser der Virchowquelle, daß auch in den Geweben der Einfluß des rectal einverleibten Calciums sich noch kräftig geltend macht.

Doch kehren wir jetzt wieder auf die durch das Mineralwasser hervorgerufene Steigerung der Phagocytose, die, wie wir fanden, in vitro ungefähr 20% betrug, zurück.

Wir bemerkten bereits oben, daß im lebenden Körper die Verhältnisse insoweit günstiger für die Phagocytose liegen als in vitro, weil das Mineralwasser als solches ein wenig hypisotonisch ist. Es macht sich nun auch noch eine andere Tatsache in derselben Richtung geltend. Erhitzt man nämlich das Wasser bei Körpertemperatur, was bei den Phagocytoseversuchen notwendig ist, so fällt $CaCO_3$ aus. Es ist dies dann für die Ca-Wirkung verloren. Wird dagegen das Wasser per os

---

[1]) Hamburger und Hekma, diese Zeitschr. 3, 88, 1907.
[2]) Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre 2, 215.
[3]) Kionka, l. c.

verabreicht, so wird das $CaCO_3$ bzw. $Ca(HCO_3)_2$ in $CaCl_2$ umgewandelt und als solches resorbiert.

Nicht ohne Interesse dürfte noch ein anderer Versuch sein, der auch wieder die Calciumwirkung des Mineralwassers hervorhebt. In dem betreffenden Versuch wurde die Leukocytensuspension während 24 Stunden in 0,9%igem NaCl belassen. Dann wurde von derselben eine kleine Menge mit dem Mineralwasser und die gleiche Menge mit frischer NaCl-Lösung vermischt. Nach $^1/_2$ Stunde wurden beide mit Kohle versetzt und das phagocytäre Vermögen beider Suspensionen ermittelt.

Leukocytensuspensionen, die während 24 Stunden in einer NaCl-Lösung von 0,9% verweilt haben, übergebracht in	Prozentgehalt der Leukocyten, die Kohle aufgenommen haben
Frische NaCl-Lösung 0,9%	$\frac{7}{214} \cdot 100 = 3{,}2\%$
Wasser der Virchowquelle	$\frac{127}{223} \cdot 100 = 56{,}9\%$

Man sieht, wie kräftig das Mineralwasser das gesunkene phagocytäre Vermögen wieder belebt hat.

Zusammenfassung.

1. Calcium befördert die Chemotaxis in erheblichem Maße.

2. Es wurde dies nachgewiesen nach 2 Methoden:

a) Dadurch, daß calciumfreie und calciumhaltige Kulturen von Bakterien (Coli) in Capillarröhrchen unter die Haut gebracht und die Längen der eingedrungenen Leukocytensäulchen miteinander verglichen wurden.

b) Dadurch, daß man calciumfreie und calciumhaltige Salzlösung in den Verdauungskanal brachte und dann ermittelte, wie groß in den beiden Fällen die Säulchen von Leukocyten waren, die in die mit Bakterienkultur beschickten Capillarröhrchen angelockt waren.

3. Sowohl bei den Versuchen a wie bei den Versuche b wurde mit den Bakterienaufschwemmungen als solchen und auch mit den durch eine Chamberland-Kerze erhaltenen Filtraten, also mit den Stoffwechselprodukten der Mikroben experimentiert.

Die Resultate stimmten miteinander überein.

4. Zur Einverleibung in den Verdauungskanal wurden zweierlei Flüssigkeiten angewandt:

1. $CaCl_2$-haltende NaCl-Lösung;
2. das calciumreiche Wasser der Virchowquelle (Kiedrich bei Eltville).

5. Einverleibung von bloß 0,1 g $CaCl_2$-enthaltender NaCl-Lösung pro Tag bei Kaninchen von etwa $3^1/_2$ kg steigerte die Chemotaxis bereits in erheblichem Maße.

Einverleibung von 60 ccm des genannten Mineralwassers, die einer Zugabe von 0,06 g $CaCl_2$ pro Tag entsprach, rief noch eine Steigerung der Chemotaxis von 50% und mehr hervor. Es sei hervorgehoben, daß die in dieser Weise erhaltenen Zahlen nur Minimumwerte vorstellen. (Vgl. S. 75 und 79.)

6. Mit der vom Mineralwasser herbeigeführten Steigerung der Chemotaxis ist der günstige Einfluß, den dasselbe auf die Phagocytose ausübt, vollkommen in Übereinstimmung. (Vgl. S. 76 und 80.)

7. Durch diese chemotaktischen Untersuchungen ist somit nachgewiesen, daß Calcium nicht nur in vitro, sondern auch im lebenden Körper die Tätigkeit bzw. Beweglichkeit der Phagocyten in sehr erheblichem Maße anregt.

Beiträge zur Hämolyse durch Lipoide.

Von

H. Liefmann und M. Cohn.

(Aus der bakteriologischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 15. April 1910.)

Einleitung.

Das eingehende Studium der hämolytischen Eigenschaften, die verschiedenen Lipoiden zukommen, ist mittelbar durch Metschnikow angeregt worden. In der Überzeugung von dem cellulären — genauer leukocytären — Ursprung der Alexine untersuchte Metschnikow die Extrakte besonders der makrophagenhaltigen Organe und stellte fest, daß sie die Eigenschaft besitzen, rote Blutkörperchen aufzulösen.[1]) Die Untersuchungen wurden von anderen Autoren weitergeführt und auf die übrigen Organe ausgedehnt, die Grundtatsache im großen und ganzen bestätigt.[2]) Gleichzeitig erkannte man die bactericide Eigenschaft der Organextrakte.[3]) Von Lipoiden war aber noch wenig die Rede. Jedoch in dem Maße, wie die wässerige Extraktionsmethode der alkoholischen das Feld räumte, drang die Erkenntnis durch, daß als wirksames Agens der hämolytischen Auszüge Fettkörper zu betrachten seien. Im allgemeinen begnügte man sich damit, überhaupt die Lipoidnatur anzudeuten[4])

---

[1]) Metschnikow, Annales de l'Inst. Pasteur, Okt. 1899; L'Immunité, Paris 1901.

[2]) Shibayama, Centralbl. f. Bakt. 30, 1901. — Klein, K. K. Ges. d. Ärzte in Wien. Sitzg. v. 20. Dez. 1901. — Tarassévitsch, Sur les Cytases. Annales de l'Inst. Pasteur, Febr. 1902.

[3]) Conradi, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 1901.

[4]) Korschun und Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1902, 27.

oder hervorzuheben.[1]) In der Tat zeigten sowohl die Organe ein verschiedenes Verhalten gegen die Manipulationen, denen sie unterworfen wurden, wie auch die Extrakte gegen die verschiedenen fettlösenden Stoffe, beispielsweise gegen Alkohol und Äther.[2]) Sodann mußte die Frage entschieden werden, welcher Klasse der Lipoide die hämolytischen — und auch bactericiden[3]) — Substanzen in den Organauszügen eingereiht werden sollten. Konnte auch keine eindeutige Antwort gegeben werden, so sprachen doch manche Befunde chemischer oder biologischer Art für die Vermutung, daß man es mit Seifen oder seifenartigen Verbindungen bzw. Fettsäuren zu tun habe.[4])

Was wir hier über die Organextrakte gesagt haben, läßt sich auf das Blutserum übertragen. Auch im Blutserum wurden hämolytische Lipoide nachgewiesen.[5]) Auch hier wurden von manchen als die wirksamen Stoffe die Seifen angesehen.[6])

Diese letzte Tatsache ist es nun vornehmlich gewesen, die einigen Forschern den Gedanken nahebrachte, daß für Vorgänge wie die Komplementhämolyse die im Serum enthaltenen blutlösenden Fettstoffe von Bedeutung seien. Da ferner z. B. Lecithin und Komplement sich bei verschiedenen Prozessen direkt gegenseitig vertreten können — so bei der Aktivierung des Kobragiftes, bei der Komplettierung kolloider Säuren[7]) —, und da das hämolytische Komplement mit den Lipoiden manche Reaktionen gemein hat, so sahen sich Landsteiner und seine Mitarbeiter zu der Ansicht bestimmt, die Komplemente ständen den Lipoiden nahe, seien vielleicht Lipoideiweiß-

---

[1]) Donath und Landsteiner, Wiener klin. Rundschau 1902, 40; Zeitschr. f. Hygiene 43, 1903. — Kyes und Sachs, Berl. klin. Wochenschr. 1903, 2 bis 4. — J. Bauer, diese Zeitschr. 10, 1908.

[2]) U. Friedemann, Arch. f. Hygiene 69.

[3]) Landsteiner und Ehrlich, Centralbl. f. Bakt. 45, 1907.

[4]) Levaditi, Annales de l'Inst. Pasteur 17, 1903. — H. Noguchi, Über gewisse chem. Kompl.-Substanzen. Diese Zeitschr. 6, 1907. — Tallqvist, Zeitschr. f. klin. Med. 61. — Morgenroth und Schäfer, diese Zeitschr. 21, 1909.

[5]) Wölfel, Journ. of infect. diseas. 1905. — Levaditi, Compt. rend Soc. Biol. 58, 1905. — U. Friedemann, l. c.

[6]) H. Noguchi, l. c. — L. v. Liebermann, Arch. f. Hygiene 62, 1907.

[7]) Landsteiner und Jagic, Wiener klin. Wochenschr. 1904; Münch. med Wochenschr. 1904.

verbindungen.[1]) Andere Autoren, die ebenfalls Vergleiche zwischen Lipoiden und Komplementen angestellt hatten, lehnten eine derartige Anschauung bedingungslos ab. So Kyes und Sachs (l.c.). Ganz entschieden setzten sich dahingegen für die Auffassung von der Lipoidnatur des Komplementes H. Noguchi[2]) und L. v. Liebermann[3]) ein. Sie versuchten ihre Hypothese zu stützen, indem sie Serum und Seife zu einem inaktiven Gemisch kombinierten; dieses künstliche Komplement übte bei v. Liebermann in Gegenwart eines unspezifischen künstlichen „Amboceptors", wie Ölsäure oder Borsäure,[4]) eine hämolytische Funktion aus, bei Noguchi sogar mit Hilfe eines Immunamboceptors. Entsprechend der Beweisführung zerfiel die Kritik, die sie zur Folge hatte, in zwei Teile. Einerseits wurden die Versuche selbst bemängelt, sei es bezüglich der Einwandsfreiheit ihrer Anordnung, sei es hinsichtlich der aus ihren Ergebnissen gezogenen Schlüsse. Auf der andern Seite hob die Kritik mehr allgemeine Gesichtspunkte hervor.

Mit diesen Fragen haben auch wir uns beschäftigt. Das Problem lautete für uns: Was spricht für die Vermutung, daß das wirksame Prinzip des hämolytischen Komplements in den Lipoiden des Serums zu erblicken ist? Um indessen einer solchen Frage näher zu treten, mußten wir uns erst über die Wirksamkeit der in Rede stehenden Fettstoffe selbst einen Überblick verschaffen. Das an der Hand der bereits vorliegenden zahlreichen Tatsachen und unserer eigenen Befunde zu tun, ist der Zweck der vorliegenden Arbeit.

I. Die angewandten Stoffe und ihre allgemeinen Eigenschaften.

Wir arbeiteten mit Hammelblutkörperchen. Sie wurden 3 mal gewaschen und, mit 0,85%iger Kochsalzlösung versetzt, als 5%ige Aufschwemmung gebraucht.

---

[1]) Landsteiner und Dautwitz, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9, 1907. — Landsteiner und Ehrlich, l. c.

[2]) H. Noguchi, l. c.; Über die chem. Inakt. usw. Diese Zeitschr. 6, 1907.

[3]) L. v. Liebermann, diese Zeitschr. 4, 1907 und l. c.

[4]) L. v. Liebermann und B. v. Fenyvessy, Über gegenseit. Aktiv. häm. unwirks. Stoffe. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Ther. 2, 1909.

Was die Lipoide selbst anlangt, so haben wir außer der Seife das Lecithin, die Ölsäure und das Cholesterin in den Kreis unserer Untersuchung gezogen. Die Seife, ölsaures Natron von Kahlbaum, wird gleichfalls mit 0,85%iger Kochsalzlösung verdünnt, meist nach vorausgehender Zerquetschung im Mörser. Die Seifenhämolyse ist ziemlich charakteristisch. Wendet man nicht ganz geringe Dosen an, so spielt sich der Vorgang im allgemeinen so ab. Nach einem im Verhältnis zur Quantität wechselnden Inkubationsstadium macht sich eine Spur Lyse bemerkbar; damit ist das Zeichen gegeben, daß nunmehr die Auflösung der Blutkörperchen sehr schnell, unter Umständen im Laufe eines Minutenbruchteils beendet sein kann.

Anders verhält sich die Ölsäure (Kahlbaum). Wir verdünnen sie gewöhnlich mit Kochsalzlösung und stellen durch energisches Schütteln mit der Hand eine leidliche Emulsion her. Gleichwohl ist das Arbeiten mit der Ölsäure nicht ganz genau, weil das Aufrahmen der Fettsäurekügelchen sich nicht vermeiden läßt. Die Hämolyse durch Ölsäure schreitet nach Überwindung des Latenzstadiums ziemlich gleichmäßig fort. Aber größere Mengen erwecken oft den Eindruck, als ob sie langsamer und schwächer lösen als kleine Mengen. Das rührt teilweise von der Trübung durch die stark konzentrierte Ölemulsion an sich her. Außerdem bilden sich bei Anwendung sehr großer Dosen graubräunliche Flocken, die zunächst aufsteigen, dann, beim Anwachsen zu größeren Konglomeraten, die Neigung haben, sich zu Boden zu senken. Das beruht wohl auf einer Präzipitierung von Erythrocytenbestandteilen und bewirkt, daß nach der Auflösung der Blutkörperchen durch viel Ölsäure die Suspensionsflüssigkeit nicht so intensiv rot erscheint wie bei der Hämolyse durch wenig Ölsäure. In dieser Beziehung hat die Ölsäure Ähnlichkeit mit der Kieselsäure.[1]) Übrigens unterdrückt ein Zusatz von Cholesterin zu der Fettsäure die Flockenbildung und Trübung wesentlich.

Von den Handelslecithinen bedienten wir uns teils des Agfa-Präparates, späterhin größtenteils des Ovolecithin-Billon von Poulenc frères, Paris. Das letztere ist in seinen Aufschwem-

[1]) Vgl. L. v. Liebermann, Über Hämagglut. u. Hämatolyse. II. Arch. f. Hygiene 62, 1907.

mungen klarer als das erste und soll nach Nerking[1]) ein fast reines Distearyl-Lecithin sein. Das Präparat wird entweder von vornherein mit Kochsalzlösung verdünnt oder zuerst mit Alkohol bzw. Äther aufgelöst und dieser aus der fertigen Aufschwemmung vertrieben. Das Lecithin löst langsam und gleichmäßig fortschreitend.

Das Cholesterin endlich ist von Merck bezogen. Es wird entweder nach Zerreibung im Mörser in NaCl-Lösung gebracht oder — so in den meisten Fällen — zuvor in heißem Methylalkohol aufgelöst.

Vergleicht man die Blutlösungskraft dieser Stoffe untereinander, so ist es bekannt, daß das Cholesterin die roten Blutkörperchen nicht zu zerstören vermag; sein Verhalten zu der Hämolyse der andern Lipoide — wie auch zu der des Komplementes — macht aber eine Besprechung notwendig. Das Lecithin-Billon löst etwa 8 bis 10mal schwächer als Ölsäure und Seife. Diese beiden halten sich ungefähr die Wage. Zwar schien am Anfang die Ölsäure keinen so intensiv hämolytischen Charakter zu besitzen wie die Seife. Seitdem wir jedoch auf das kräftige Schütteln der Fettsäure-Emulsion Wert legen, nehmen wir auch an ihr eine sehr bedeutende blutlösende Energie wahr.

Es sei hinzugefügt, daß wir im allgemeinen nicht auf die Auffindung der kleinsten noch lösenden Dosen ausgegangen sind, sondern meistens schnell oder mittelschnell lösende Mengen gewählt und ihre Wirkung bei 37° zeitlich verfolgt haben. Die hämolytische Fähigkeit der Seife in verschiedenen Dosen zeigt die folgende Tabelle.

Nr.	NaCl	$^1/_{10000}$ Seife	Blk.	Total gelöst nach
1	1,5	2,0	0,5	5 Min.
2	2,0	1,5	„	6 „
3	2,5	1,0	„	10 „
4	2,6	0,9	„	15 „
5	2,7	0,8	„	20 „
6	2,8	0,7	„	52 „
7	2,9	0,6	„	55 „ ungefähr
8	3,0	0,5	„	60 „
9	3,1	0,4	„	$3^1/_4$ St. „

NaCl = 0,85%ige Kochsalzlösung. Blk. = 5%ige Hammelblutkörperchen-Aufschwemmung.

[1]) Nerking, diese Zeitschr. 23, 1909.

Oftmals löste die Seife noch stärker. In diesem Falle bemerken wir einen großen Sprung in der Lösungszeit zwischen der Dosis 0,8 und 0,7; besonders groß aber ist der Unterschied zwischen 0,5 mit 60 Min. und 0,4 mit $3^1/_4$ St. Grade bei den kleinsten Dosen fallen aber naturgemäß kleine Pipettierfehler weit mehr ins Gewicht als bei den großen. Ähnliche Tabellen wie für die Seife erhält man für die Ölsäure und bei relativ größeren Dosen auch für das Lecithin. Es sei erwähnt, daß die Lipoide in isotonischer Rohrzuckerlösung schwächer wirken als in Kochsalz,[1]) nur bei der Seife ist dies nicht ausgesprochen.

Friedemann und Sachs (l. c.) haben gesehen, daß auch bei 0° etwas Seife von den Blutkörperchen gebunden wird. Es war uns nicht gut möglich, diese Behauptung nachzuprüfen: wir konnten nicht mit genügender Sicherheit ausschließen, daß die Seife in der Kälte teilweise ausfällt und dann beim Zentrifugieren sedimentiert. Sapo medic. jedenfalls gerät in der Kälte in einen Zustand gelatinöser Erstarrung.

II. Das Verhalten des Immunamboceptors zu der Lipoidhämolyse.

Im Hinblick auf den Zweck dieser Untersuchung muß das Verhalten des Amboceptors zu der Lipoidhämolyse ein besonderes Interesse beanspruchen. Hiermit begeben wir uns allerdings, soweit die Seife in Betracht kommt, auf ein umstrittenes Gebiet. Während Noguchi[2]) berichtet, daß nicht mehr lösende Dosen Seife und inaktives Seifen-Serum-Gemisch mit Hilfe eines Amboceptors die roten Blutkörperchen auflösten, sprechen sich die meisten Nachuntersucher in verneinendem Sinne aus. Sie konstatierten sogar, daß eine Sensibilisierung die Seife hemmt. So Hecker[3]), v. Dungern und Coca[4]) u. a. Bauer (l. c.) inaktivierte hämolytische alkoholische Organextrakte und konnte durch Hinzufügung von Amboceptor zu keiner Reaktivierung gelangen.

---

[1]) Vgl. Bang in Asher-Spiro, Ergebn. d. Physiol. 9, 1909; Kobragift u. Hämolyse. III. Mitteil. Diese Zeitschr. 23, 6. Heft, 1910.

[2]) Noguchi, Über gewisse chem. Komplementsubst. Diese Zeitschr. 6, 1907.

[3]) Hecker, Arbeiten a. d. Kgl. Inst. f. experim. Ther. zu Frankfurt a. M. 1907, 3. Heft.

[4]) v. Dungern und Coca, Berl. klin. Wochenschr. 1908, 7.

Noguchi hat stark sensibilisierte Blutkörperchen gewaschen und eine Beförderung der Seifenhämolyse gesehen. Auch v. Dungern und Coca, ebenso Hecker, haben durch Auswaschen das überschüssige Immunserum entfernt und doch — wie erwähnt — die Beobachtung Noguchis nicht bestätigen können. In der Mitte stehen Friedemann und Sachs[1]), die bei Unterlassung des Waschens Hemmung, nach Eliminierung des Serumeiweißes zwar keine Hemmung, niemals aber eine Begünstigung der Seifenhämolyse durch den Immunkörper beobachtet haben. Die größere Widerstandsfähigkeit erst sensibilisierter und dann nicht gewaschener Erythrocyten führen sie auf Eiweißhemmung zurück. Auch wir haben gesehen, daß amboceptorbeladene (darauf nicht gewaschene) Blutkörperchen ziemlich konstant langsamer von der Seife aufgelöst werden als amboceptorfreie Blutzellen. (Der Amboceptor war vom Kaninchen gewonnen.) Diese Hemmung ist bei Anwendung geringer Seifenmengen sehr ausgesprochen, bei größeren Quantitäten auch deutlich, aber nicht so intensiv, und bei Benutzung sehr großer Dosen fällt die Hemmung fort, bzw. entzieht sie sich der Wahrnehmung. Jedenfalls dürfte bei unserer Konzentration des Immunserums von 1 : 400 die in 0,5 ccm (für 0,5 Blut) enthaltene Eiweißmenge allein zu einer ausreichenden Erklärung für die Resistenz sensibilisierter Erythrocyten nicht ganz genügen. Zentrifugierten wir aber die mit Amboceptor behandelten Blutkörperchen und gossen die überstehende Flüssigkeit vom Sediment ab, so wurde häufig zu unserer Überraschung das so vorbereitete Blut schneller von der Seife zerstört als das unpräparierte. Diese Beobachtung hat auch von Knaffl-Lenz[2]) gemacht. Können wir jedoch bei Unterlassung des Waschens die Hemmung der Seife durch den Amboceptor nicht als bloße Eiweißhemmung deuten, so dürfen wir noch weniger für die schnellere Auflösung sensibilisierter und zentrifugierter Blutkörperchen eine spezifische Amboceptorfunktion verantwortlich machen. Denn das Zentrifugieren — geschweige das wiederholte Waschen — amboceptorvorbehandelter Blutkörperchen darf nicht als ein in jeder Beziehung harmloser Eingriff hingenommen werden. Immunserum agglutiniert, das eine mehr, das andere weniger; das tritt grade

[1]) Friedemann und Sachs, diese Zeitschr. 12, 1908.

[2]) v. Knaffl-Lenz, diese Zeitschr. 20, 1909.

nach dem Zentrifugieren des sensibilisierten Blutes deutlich in die Erscheinung und macht sich durch die mehr oder minder schwere Zerteilbarkeit des Sedimentballens kenntlich. Besonders das Aufschütteln agglutinierter Blutkörperchen bedeutet aber häufig eine Schwächung ihrer Widerstandskraft gegen neue Schädigungen, kann sogar etwas zur Hämolyse führen. Ob teilweise auf dieses Moment, ob nur auf die Wahl der hämolytischen Systeme oder auch auf andere Ursachen die Verschiedenheit der Versuchsergebnisse bei den einzelnen Untersuchern zurückzuführen ist, entzieht sich unserer Beurteilung.

Ist demnach die Ausschaltung des Immunserumeiweißes durch Waschen nicht ganz einwandsfrei, so erscheint uns der entgegengesetzte Weg ratsamer. Wenn in unserer wenig konzentrierten Amboceptorlösung nur das Eiweiß für die Hemmung der Seifenhämolyse anzuschuldigen ist, dann müßte der Ausschlag um so größer sein, je günstigere Gelegenheit wir dem Immunserumeiweiß bieten, die Seife zu binden. Diese Bedingung ist erfüllt, wenn wir nicht zuerst die Blutkörperchen mit dem Amboceptor — gewöhnlich 10 bis 15 Min. bei 37° — zusammenbringen, sondern den letzten mit der Seife digerieren und dann erst Blut hinzu tun.

Nr.	NaCl	$^1/_{10000}$ Seife	$^1/_{400}$ Amb.	Blk.	$^1/_{400}$ Amb.	Total gelöst nach
	15 Min. 37°			10 Min. 37°		
1	2,8	0,7	—	0,5	—	20 Min.
2	2,8	"	—	"	—	20 "
3	2,8	"	—	"	—	25 "
1a	2,3	"	—	"	0,5	32 "
2a	2,3	"	—	"	"	33 "
3a	2,3	"	—	"	"	34 "
1b	2,3	"	0,5	"	—	39 "
2b	2,3	"	"	"	—	32 "
3b	2,3	"	"	"	—	32 "

Amb. = Amboceptor.

In der Tabelle ist jedes Röhrchen 3mal angesetzt, um gewisse Schwankungen berücksichtigen zu können. Die Verzögerung durch den Amboceptor beträgt ungefähr 10 bis 13 Min., und zwar gleichgültig, ob der Amboceptor vorher mit der Seife digeriert ist oder nicht.

Wir haben ferner die amboceptorhaltige Flüssigkeit $^1/_2$ St. bei 80° gehalten, dann Blut, nach 10 Min. Seife zugesetzt.

Nr.	NaCl	$^1/_{10000}$ Seife	Blk.	$^1/_{400}$ Amb. — 80°	Total gelöst nach
			10 Min. 37°		
1	2,3	0,7	0,5	0,5	30 Min.
2	2,3	"	"	"	29 "
3	2,3	"	"	"	28 "
1a	2,8	"	"	—	24 "
2a	2,8	"	"	—	26 "
3a	2,8	"	"	—	25 "

Die Seife hat um wenig langsamer gelöst als im vorigen Versuch, aber der Amboceptor hat nur um ca. 4 Min. die Hämolyse verzögert. Es ist also immerhin möglich, daß das Eiweiß des Immunserums grade dann eine besondere Hemmungskraft entfaltet, wenn es an die Blutkörperchen verankert ist und dort gewissermaßen den Dienst einer Schutzwehr leistet.

Für die von uns geübte Versuchsweise wird deshalb etwa folgende Zusammenfassung dem wirklichen Sachverhalt nahe kommen: Das Eiweiß des schwach konzentrierten Immunserums beteiligt sich möglicherweise in einem gewissen Maße an der Verzögerung der Seifenhämolyse, der größere Anteil ist wahrscheinlich dem spezifischen Immunkörper zuzusprechen.

Daß der Eiweißhemmung wohl nicht die allein ausschlaggebende Rolle bei dem geschilderten Vorgang zufällt, darf auch aus dem Fehlen dieser Erscheinung in den meisten Fällen bei der Ölsäure-Hämolyse geschlossen werden. Nach v. Dungern und Coca (l. c.) freilich verhält sich in dieser Beziehung die Olsäure wie die Seife; wir haben dies indessen nicht bestätigt gefunden. Wir fügen hinzu, daß auch auf die Blutauflösung durch Lecithin der Amboceptor ohne Einfluß ist, obwohl hier geringe Schwankungen vorkommen; zuweilen hatte es nämlich sogar den Anschein, als ob das Lecithin durch den Immunkörper begünstigt werde.

III. Beziehungen der Lipoide zueinander.

Im nun folgenden Kapitel sollen einige Beziehungen der Lipoide zueinander bei der Blutauflösung besprochen werden.

Das Cholesterin kommt nur als Hemmungskörper in Betracht, allerdings in sehr verschiedenem Maße. So ist die Hemmung der Ölsäure gegenüber recht wenig ausgesprochen

und nur bei Anwendung verhältnismäßig großer Dosen Cholesterin deutlicher. Wir lassen ein Beispiel folgen.

Nr.	1/10000 Ölsäure	NaCl	1/1000 Cholest.	Blk.	Total gelöst nach
	15 Min. 37°				
1	1,0	2,5	—	0,5	8 Min.
2	1,0	2,0	0,5	„	11 „
3	0,5	3,0	—	„	11 „
4	0,5	2,5	0,5	„	40 „

Wir sehen: eine so große Dosis Cholesterin wie 0,5 l (Gewichtsmaß):1000 verzögert eine Ölsäuremenge von 1,0 l (Raummaß):10000 nur um 3 Minuten. Erst ein noch größeres Mißverhältnis zwischen den Quantitäten der beiden Körper zu ungunsten der Fettsäure gibt einen bemerkbareren Ausschlag. Vielleicht handelt es sich dann um Adsorptionserscheinungen. (Vgl. Kyes und Sachs, l. c., bezüglich der Hemmung des Kobragift aktivierenden Komplementes durch Cholesterin.) Zwar wäre die Ölsäure dank ihrem chemischen Charakter an sich als Angriffssubstanz für das interferierende Cholesterin geeignet, da dessen Wirkung nach Hausmann[1]) u. a. auf der OH-Gruppe beruht, also gerade Säuren seinem Einfluß unterliegen. Aber unter Umständen kann eben der neu entstandene Körper gleichfalls hämolytisch sein. In dem Sinne bezeichnen Faust und Tallqvist[2]) den Ölsäure-Cholesterin-Ester als stark hämolytisch. Doch ist festzuhalten, daß beim einfachen Mischen der beiden Substanzen noch keine neue chemische Verbindung zu entstehen braucht, es kann bei einer einfachen Anlagerung sein Bewenden haben.[3]) Aber auch wenn wir die Mischung der Stoffe in Substanz auf 80° erhitzt haben, bemerkten wir an dem so gewonnenen Produkt keine Verminderung des hämolytischen Vermögens.

Wie zur Ölsäure, so verhält sich das Cholesterin auch zur Seife, was die Hemmung anbetrifft. Nach Isovesko und Foucand[4]) soll zwar Na oleinic. durch Cholesterin gehemmt

[1]) Hausmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6.

[2]) Faust und Tallqvist, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 57, 1907.

[3]) Vgl. Aschoff, Zieglers Beiträge z. pathol. Anat. 47, 1909.

[4]) Isovesko und Foucand, Compt. rend. Soc. Biol. 64, 1908. Zitiert nach Meyerstein.

werden. K. Meyer[1]) bestreitet es. Noguchi[2]) gesteht eine Verzögerung seiner Seifen-Serum-Mischungen durch große Mengen Cholesterin zu, aber der Einfluß sei unsicher. Meyerstein[3]) endlich spricht von einer weitgehenden Hemmung der Seife nur beim Aufkochen beider Stoffe zusammen, so auch v. Liebermann und v. Fenyvessy[4]). Über deutliche zeitliche Verzögerung nicht gekochter Mischungen berichtet Meyerstein desgleichen, jedoch sind seine Cholesterin-Mengen sehr groß. Die Tabelle, die wir folgen lassen, zeigt, ähnlich wie oben bei der Ölsäure, daß selbst das 5fache Quantum Cholesterin nicht stark verzögert und daß erst die 10fache Dosis von Belang ist.

Nr.	1/10000 Seife	NaCl	1/1000 Cholest.	Blk.	Total gelöst nach
	15 Min. 37°				
1	1,0	2,5	—	0,5	8 Min.
2	1,0	2,0	0,5	„	13 „
3	0,5	3,0	—	„	ca. 1 1/2 St.
4	0,5	2,5	0,5	„	nach 2 St. ungelöst

Anders das Lecithin. Mit dem Lecithin-Agfa läßt sich die Verzögerung bzw. vollständige Hemmung wegen der starken Trübung der Suspensionen nicht gut demonstrieren. Die viel klarere Verdünnung des Lecithin-Billon eignet sich besser. Derselbe Versuch, mit Amboceptor gemacht, führte ungefähr zu dem gleichen Ergebnis.

Nr.	1/1000 Lecithin-Billon	NaCl	1/1000 Cholest.	Blk.	
	15 Min. 37°				
1	1,0	2,5	—	0,5	nach 2 Min. total gelöst
2	1,0	2,0	0,5	„	„ 1 1/2 St. ungelöst
3	1,0	2,2	0,3	„	„ 1 1/2 „ „
4	1,0	2,4	0,1	„	„ ca. 1 1/2 St. total gelöst
5	0,5	3,0	—	„	„ 8 Min. „ „
6	0,5	2,9	0,1	„	„ 1 1/2 St. ungelöst
7	0,5	2,9	0,05	„	„ 1 1/2 „ Spur

Es zeigt sich also, daß selbst die 10mal kleinere Menge Cholesterin auf Lecithin einen stark verzögernden Einfluß hat. Es kann aber auch zu dauernder Hemmung kommen. So ist

[1]) K. Meyer, Arch. f. Hygiene 65, 1908.
[2]) Noguchi, Über gew. chem. Kompl.-Subst. Diese Zeitschr. 6, 1907.
[3]) Meyerstein, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 60, 1909.
[4]) v. Liebermann und v. Fenyvessy, Über gegenseit. Aktiv. usw., l. c.

in einem Versuch 1,0 Lecithin-Billon $^1/_{1000}$, das mit und ohne Amboceptor 0,5 Blk. in 5 bzw. 6 Min. total löste, mit 0,5 Cholesterin $^1/_{1000}$ versetzt, nach 24 St. (erst 2 St. 37°, dann Eisschrank) ohne Wirkung geblieben; ebenso hat 0,5 Lecithin, das in 15 Min. total löste, mit 0,2 Cholesterin versetzt, nach 24 St. nur schwache bzw. fast gar keine Lösung gegeben. — Vgl. hierzu auch eine Äußerung von Kyes und Sachs, l. c. am Schluß.

Solchen Hemmungsbeziehungen wie zwischen Cholesterin und Lecithin begegnen wir bei der Kombination der übrigen — hämolytischen — Fettstoffe nicht; aber wir haben es auch nicht durchweg mit Beschleunigungen zu tun.

Die Seifen-Hämolyse wird durch Ölsäure im allgemeinen nicht verzögert, unter Umständen sichtlich beschleunigt; dann z. B., wenn man 1,0 Ölsäure $^1/_{40000}$ — etwas weniger, doch ebenfalls erkennbar, wenn man 0,4 $^1/_{40000}$ erst 5 Min. bei 37° auf 0,5 Blutkörperchen einwirken läßt. An der oben besprochenen Amboceptorhemmung wird dabei nichts geändert. Die genannten Ölsäuremengen lösten nach $3^1/_4$ St. (37°) nur sehr schwach bzw. gar nicht. Sogenannte Summation kann natürlich nicht ausgeschlossen werden. Die Seifendosis betrug 1,5 $^1/_{20000}$, die allein in 35 Min., mit Amboceptor in 60 Min. total löste.

Wurde der gleichen Seifendosis 1,0 Lecithin $^1/_{10000}$ vorangeschickt, so trat eine Beschleunigung ein, während 0,5 Lecithin keinen Einfluß hatte. Wurden aber beide Substanzen erst 5 Min. miteinander bei 37° gehalten, so brachte die größere Lecithinquantität eine nur geringe Beschleunigung zustande, die kleinere anscheinend eher eine Verzögerung. 1,0 Lecithin allein hatte (mit und ohne Amboceptor) nach 2 St. gar nicht, 2,0 nur schwach gelöst.

Merkbarer und auffallend ist die Verzögerung des Lecithins durch einen Zusatz von Ölsäure. Hierauf bezieht sich folgende Tabelle.

Nr.	NaCl	$^1/_{40000}$ Ölsäure	$^1/_{2000}$ Lecith.-Billon	37° 5 Min.	Blk.	37° 5 Min.	$^1/_{2000}$ Lecith.-Billon	Total gelöst nach
1	2,5	—	0,8	+	0,5	—	—	ca. 1 Min.
2	1,0	1,0	„	+	„	—	—	11 „
3	2,1	0,4	„	+	„	—	—	17 „
4	1,0	1,0	„	—	„	—	—	11 „
5	2,1	0,4	„	—	„	—	—	19 „
6	1,0	1,0	—	—	„	+	0,8	1 „
7	2,1	0,4	—	—	„	+	0,8	12 „

(Weil der Versuch eigentlich noch mit mehreren Zusätzen vervollständigt werden sollte — was nachher nicht geschehen konnte —, so sind die Flüssigkeitsmengen nicht auf gleiches Niveau gebracht. Hierdurch wird jedoch — wie festgestellt ist — das Ergebnis nicht beeinträchtigt. Im allgemeinen wurde auf 4,0 oder 2,5 ccm bei 0,5 Blk. aufgefüllt. — „+" heißt: 5 Min. bei 37° digeriert, „—" heißt: nicht digeriert, sondern sofortige Folge der nächsten Substanz. — Der Versuch fällt in eine Periode außerordentlich gesteigerter Empfindlichkeit der Hammelblutkörperchen gerade gegen Lecithin.)

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß kleine Ölsäuremengen mehr gehemmt haben als große, und zwar besonders bei der Mischung von Lecithin und Ölsäure. Wurde die Ölsäure vorher den Blutkörperchen zugesetzt, so blieb bei der größeren Dosis die Verzögerung fort, bei der kleineren aber fiel sie nur etwas schwächer aus. Es handelt sich in dieser Tabelle zwar nur um eine Verzögerung von 11 bis 18 Min. Das ist aber in Anbetracht der enormen Intensität des Lecithins eine sehr beachtenswerte Hemmung.

IV. Der Einfluß des Serums auf die Hämolyse durch Lipoide.

Wie in der Einleitung ausgeführt, spielten in den Versuchen, die von den Verfechtern der These: „Komplement gleich Lipoid oder Lipoid-Eiweißverbindung" angestellt wurden, Verbindungen von Seife mit Serum eine Rolle. Im hämolytischen Komplement solle das Eiweiß eine nebensächliche, vielleicht nur retardierende Bedeutung haben. Wir können es deshalb nicht umgehen, den Einfluß des Serums auf die Hämolyse durch Lipoide zu untersuchen. Wir beschäftigen uns mit intaktem Serum verschiedener Herkunft in toto und mit dessen Teilen. Es interessiert uns in dieser Beziehung nicht die restlose Zerlegung des Serums in seine Fraktionen, sondern die durch sogenannte Spaltung des hämolytischen Komplementes gewonnenen Bestandteile. Nach Ferrata[1]) nämlich läßt sich das Komplement durch Dialyse in zwei Komponenten aufspalten, deren jede, für sich allein unwirksam, nur im Verein mit der anderen zur Lyse befähigt ist. Wir bedienten uns, um das Meerschweinchenserum zu spalten, eines

[1]) Ferrata, Berl. klin. Wochenschr. 1907, 13.

von H. Sachs und Altmann[1]) angegebenen Verfahrens: Verdünnung des Serums mit HCl-haltigem Aqua destill. Unter Vernachlässigung der Tatsache, daß bei der Komplementspaltung im wesentlichen nur die Euglobulinfraktion ausfällt, während außer dem Albumin noch die Pseudoglobulinfraktion in Lösung bleibt, wird im folgenden einfach von Globulin und Albumin gesprochen. Diese Bezeichnungen sind demnach identisch mit den Ausdrücken „Mittelstück" und „Endstück" der Autoren.[2])

Schreibt L. v. Liebermann[3]) auch dem Hühnereiweiß eine gegen Seife gerichtete Hemmungseigenschaft zu, so erklärt dies K. Meyer (l. c.) mit der von v. Liebermann angewandten starken Konzentration des Eiweißes, er selbst fand keine Hemmung. Nach den sonstigen Angaben hemmt Serum, erhitzt und nicht erhitzt, auch Albumin (meist Serumalbumin Merck) die Seife. Werden beide Substanzen erst gemischt, dann erhitzt, so ist die Hemmung intensiver. Das beobachtete man schon gelegentlich der Untersuchung der Organextrakte. Das ist wohl auch der Grund, weshalb beispielsweise Tarassévitsch (l. c.) die von ihm hergestellten Organauszüge in filtriertem Zustande koktostabil, in unfiltriertem thermolabil gefunden hat. Auch Landsteiner und Ehrlich (l. c.) konnten die bactericide Eigenschaft der Extrakte aus Milz und Froschovarien, ebenso der Ölsäure durch Erwärmen mit Eiweiß aufheben.[4]) Friedemann und Sachs (l. c.) sahen bei $^1/_2$stündigem Erwärmen eines noch gerade hämolytischen Gemisches von Seife und Pferdeserum auf 55° im Gegensatz zu Noguchi noch keine Inaktivierung, wohl aber bei Erhitzen auf 70° $^1/_2$ Stunde lang.

Wir können hinzufügen, daß nicht nur Seife und Ölsäure, sondern auch Lecithin durch Serum, auch unerhitzt, stark gehemmt wird. Bei der Prüfung der einzelnen Eiweißbestandteile des Meerschweinchenserums stellen sich jedoch tiefgreifende Unterschiede zwischen den beiden oben bezeichneten Spaltungsprodukten heraus.

[1]) H. Sachs, Hämolysine und Cytotoxine des Blutserums. In Kraus-Levaditi, Handb. d. Technik u. Methodik d. Immunitätsforsch. 2, 1909.

[2]) Brand, Berl. klin. Wochenschr. 1907, 34.

[3]) L. v. Liebermann, l. c., Über hämolyt. Komplemente usw.

[4]) Vgl. Raubitschek und Ruß, Wiener klin. Wochenschr. 1908, 8.

K. Meyer (l. c.) hat gezeigt, daß Seife durch Albumin wie auch durch Globulin gehemmt wird. Wir konnten es mit unseren Komplement-Komponenten bestätigen.

Nr.	NaCl	$^1/_{10\,000}$ Seife	$^1/_{10}$ Globul.	$^1/_{10}$ Album.	Blk.		Nach 24 St.
		15 Min. 37°					
1	1,5	0,5	—	—	0,5	nach 17 Min. total gelöst	—
2	1,0	„	0,5	—	„		Kuppe
3	0,5	„	1,0	—	„	nach 1 St. ungelöst	ungelöst
4	1,0	„	—	0,5	„		fast ungelöst
5	0,5	„	—	1,0	„		Kuppe

Ein derart gleichsinniges Verhalten der beiden Serumfraktionen wird der Ölsäure gegenüber völlig vermißt: während sie vom Albumin deutlich gehemmt wird, ist das Globulin ohne einen erheblichen Einfluß. Im folgenden Versuch ist das Komplement 10fach verdünnt, desgleichen Globulin und Albumin im Verhältnis zum intakten Serum.

Nr.	0,2% Ölsäure	NaCl	$^1/_{10}$ Kompl.	$^1/_{10}$ Glob.	$^1/_{10}$ Alb.	Blk.	
		10 Min. 37°					
1	0,3	3,7	—	—	—	0,5	nach 10 Min. total gelöst
2	„	3,2	0,5	—	—	„	„ 15 „ „ „
3	„	2,7	1,0	—	—	„	„ 1 St. schwach gel.
4	„	2,7	—	1,0	—	„	„ 12 Min. total gelöst
5	„	1,7	—	2,0	—	„	„ 12 „ „ „
6	„	3,2	—	—	0,5	„	„ 24 „ „ „
7	„	2,7	—	—	1,0	„	„ 1 St. ungelöst
8	$1,0\,^1/_{10}$	3,0	—	—	—	„	„ 27 Min. total gelöst
9	„	2,5	0,5	—	—	„	„ 1 St. ungelöst
10	„	2,0	—	1,0	—	„	„ 17 Min. total gelöst
11	„	2,5	—	—	0,5	„	„ 1 St. ungelöst

Stellt man dem Ergebnis dieses Versuches die nicht geringe Hemmung der Seife durch Globulin gegenüber, so ist dessen ganz anders geartete Beziehung zu der Ölsäure unverkennbar: während 1,0 Ölsäure $^1/_{10}$ nach einer Digerierung von 10 Min. mit 0,5 Albumin nach 1 St. keine Spur von Lösung aufweist, hat die doppelte Menge Globulin scheinbar sogar begünstigt. An dieser Tatsache ändert Erhitzen des Globulins auf 56° nicht viel. Dagegen verhalfen ihm höhere Temperaturgrade zur Aneignung eines hemmenden Charakters, sei es, daß das Globulin zusammen mit der Ölsäure $^1/_2$ St. auf 60° oder das

Eiweiß zunächst allein in gleicher Weise erhitzt und darauf ungefähr 25 Min. mit der Ölsäure bei 37° digeriert wird. Kyes und Sachs[1]) beobachteten eine ähnliche Erscheinung bei der Vereinigung von Hämoglobin und Lecithin mit Beziehung auf die Aktivierung des Kobragiftes.

Das unterschiedliche Verhalten der Ölsäure zu den beiden Komponenten des gespaltenen Meerschweinchen-Komplementes läßt sich gewissermaßen ad oculos demonstrieren, wenn man in folgender Weise verfährt. Versetzen wir intaktes Meerschweinchenserum mit einer Menge Ölsäure im Überschuß, d. h. einer Menge, die von der abgemessenen Serumdosis nicht mehr ganz gehemmt wird, also noch eine Hämolyse herbeiführt, so ist es möglich, den Überschuß an gebundener Ölsäure annähernd zu bestimmen; das geschieht, indem die Lösungszeit des Ölsäure-Serum-Gemisches mit der Lösungszeit abgestufter Mengen serumfreier Ölsäure verglichen wird. Wir haben nun zwei gleiche Quantitäten Serum mit zwei verschiedenen Mengen Ölsäure (mit Aqua dest. verdünnt) etwa 10 Min. stehen lassen und dann so viel HCl-haltiges Aqua dest. zugefügt, daß das Gesamtverhältnis zwischen Serum, Aqua dest. und HCl genau das gleiche war wie sonst bei der Komplementspaltung (nach Sachs und Altmann). Das Ganze verblieb entsprechend der Vorschrift 1 St. bei Zimmertemperatur. Das Globulin fiel aus, und durch Zentrifugieren wurde eine Scheidung von Globulin und Albumin bewerkstelligt, das Albumin abgegossen und nicht filtriert, danach mit NaOH neutralisiert (entsprechend der vorher beigegebenen Salzsäure) und mit stärker konzentrierter Kochsalzlösung bis zur Isotonie und 10fachen Verdünnung im Verhältnis zur ursprünglichen Serummenge ergänzt. Auch das Globulin wurde mit NaCl 0,85% 10fach verdünnt (auf das Serum bezogen). Nunmehr prüften wir die hämolytischen Eigenschaften der beiden Fraktionen. Der Versuch mit weniger Fettsäure hat das Ergebnis gezeitigt, daß der gesamte Überschuß an nicht gebundener, also wirksamer Ölsäure in der Globulinlösung nachzuweisen war; diese zerstörte die Blutkörperchen in der gleichen Zeit wie dasselbe Gemisch von

[1]) Kyes und Sachs, Berl. klin. Wochenschr. 1903, 2 bis 4. Vgl. auch H. Sachs, Wiener klin. Wochenschr. 1908, 10.

Ölsäure und ungespaltenem Komplement im Vorversuch. Die übrige Ölsäure war vom Albumin gebunden und unfähig zur Hämolyse gemacht. In dem zweiten Versuch, der sich vom ersten nur durch die größere Ölsäuremenge unterscheidet, hat das Globulin ungefähr ebenso viel Ölsäure mit niedergerissen wie vorher, d. h. es löste etwa in der gleichen Zeit wie oben; der weitere Überschuß an Ölsäure aber ist in der Albuminfraktion verblieben, der es jetzt auch zu einer beträchtlich schnellen Hämolyse brachte. Die Schnelligkeit dieser Hämolyse entsprach ungefähr der Differenz zwischen dem Gesamtüberschuß an Ölsäure minus dem Teil, der vom Globulin niedergerissen worden war.

Das Resultat dieser Versuche bereitet dem Verständnis in einem Punkte Schwierigkeiten. Wie kann das ausgefällte Globulin die freie Fettsäure (einen Teil des Überschusses) mit niederreißen, wo doch ihr Aufrahmungsbestreben im allgemeinen beim Zentrifugieren besonders lebhaft zur Geltung kommt? Die Frage durch Waschen zur Entscheidung zu bringen, mißglückte. Entweder müssen wir also annehmen, daß die Ölsäure durch feste Partikel mechanisch mitgerissen werden kann, ohne sich an die Teilchen zu binden. Oder das Globulin erwirbt während des Ausfallens bzw. in ungelöstem Zustande ein größeres Bindungsvermögen, das nach der Auflösung wieder verschwindet. Oder das Globulin bindet zwar die Ölsäure auch in gelöstem Zustande, aber hemmt sie nicht, ein Vorgang, ähnlich demjenigen des „Abblutens" nach Korschun und Morgenroth (l. c.). Das letzte halten wir nicht für das wahrscheinlichste. Denn Ölsäureemulsion hellt sich auf Zusatz von intaktem Serum[1]) und Albumin schnell auf, mehr oder weniger, je nach dem Überschuß von Fettsäure; Globulin erzeugt diese Wirkung kaum. Mehr Wahrscheinlichkeit ist nach den allgemeinen Erfahrungen vielleicht der an zweiter Stelle genannten Möglichkeit zuzubilligen, die mit dem veränderten physikalischen Zustand des Globulins rechnet. Jedoch auch die ersterwähnte Möglichkeit möchten wir nicht durchaus ablehnen.

Eine Mittelstellung zwischen der Seife und der Ölsäure bezüglich seines Bindungsverhältnisses zum Globulin nimmt das

[1]) Vgl. Bauer l. c.

Lecithin ein; es nähert sich aber in dieser Beziehung viel mehr der Ölsäure als der Seife. Vom Albumin wird es ebenso gebunden. Von einer entschiedenen und regelmäßigen Bindung durch Globulin im Sinne einer Verzögerung kann hingegen keine Rede sein. Denn 0,5 Lecithin-Billon, das 0,5 Blutkörperchen in 11 Min. total lackfarben gemacht hat, ist sogar durch einen Zusatz von 4,0 Globulin $^1/_{10}$ nur um 24 Min. verzögert worden, ebenso mit Amboceptor. Und zwar begann in allen Röhrchen die Hämolyse ziemlich gleichzeitig, nur daß in den mit Globulin beschickten das Ende der Blutauflösung langsamer erreicht wurde. Auch als 0,5 Lecithin-Billon mit 1,0 Globulin $^1/_{10}$ $^1/_2$ St. auf 60° erhitzt wurde, löste es 0,5 Blk. immer noch in 23 Min., während das globulinfreie Lipoid in 5 bzw. 8 Min. gelöst hatte; noch geringer war der Unterschied, wurde das Globulin allein auf 60° erhitzt und dann etwa 25 Min. mit dem Lecithin bei 37° digeriert. Den Unterschied zwischen den beiden Komplementfraktionen in ihrer Wirkung auf die Lecithinhämolyse wird die nächste Tabelle veranschaulichen.

Nr.	$^1/_{1000}$ Lecithin	NaCl	$^1/_{10}$ Glob.	$^1/_{10}$ Alb.	Blk.	
	15 Min. 37°					
1	0,3	1,7	—	—	0,5	nach 20 Min. total gelöst
2	„	1,2	0,5	—	„	„ 28 „ „ „
3	„	0,7	1,0	—	„	„ 30 „ „ „
4	„	1,2	—	0,5	„	„ 1 St. ungelöst
5	„	0,7	—	1,0	„	„ 1 „ „

Nach 24 St. zeigten die beiden Röhrchen mit Albumin „Kuppe".

Einmal haben wir indessen eine bedeutende Verzögerung gesehen. Da löste 0,3 Lecithin-Billon $^1/_{1000}$ allein 0,5 Blk. nach 15 Min.; nachdem es 15 Min. mit 0,5 Glob. $^1/_{10}$ (aktiv und $^1/_2$ St. 56°) bei 37° gestanden, löste es erst nach ca. $1^1/_2$ St. Hier handelte es sich um nicht mehr frisches Globulin. Was die Komplementhämolyse anbetrifft, hält sich Globulin verhältnismäßig lange. Wir haben den — allerdings nur unbestimmten — Eindruck, daß durch Lagern die Bindungskraft des Globulins für Lecithin erhöht wird.

Wir können demnach sagen: Albumin hemmt Seife, Ölsäure und Lecithin, Globulin hemmt Seife deutlich,

aber Lecithin nicht wesentlich, Ölsäure gar nicht (wenn unerhitzt).

Worin das Wesen der Hemmung zu erblicken ist, das ist noch nicht klargestellt. K. Meyer (l. c.) hat es wahrscheinlich gemacht, daß wir es weder mit einer rein adsorptiven noch einer rein chemischen Bindung zu tun haben, er nennt es „Zustandsaffinität". Wir schalten hier ein, daß auch die Hämolyse einer CO_2-haltigen Kochsalzlösung durch Albumin mehr als durch Globulin gehemmt wird. Es hat so fast den Anschein, als habe das Albumin eine größere Affinität zu säureartigen Körpern als das Globulin (die Seife ist in dieser Hinsicht amphoter), während das Globulin dann eine größere Affinität zu basischen Stoffen besäße. Mit einer derartigen Auffassung ließen sich mehrere Tatsachen in Einklang bringen. Einmal sprechen wirklich manche Autoren von einer „Globulinsäure", die aus Na_2CO_3 im Vakuum Kohlensäure frei zu machen imstande sein soll. Ferner erinnern wir an eine Mitteilung von Izar[1]), nach der die Hämolyse mittels der Hydroxyde der Schwermetalle durch Serumglobulin gehemmt werde, kaum durch Serumalbumin. Endlich werden wir andern Orts darlegen, daß die Inaktivierung des hämolytischen Komplements durch (die OH-Gruppe des) Cholesterin nur das Globulin trifft. Keinesfalls genügen jedoch die aufgezählten Momente, um die aufgeworfene Frage auch nur annähernd als beantwortet zu betrachten.

V. Beschleunigungsphänomene.

Hat die Mischung von Fettkörper und Eiweiß eine zuweilen recht ansehnliche Hemmung der Blutauflösung durch die Lipoide zur Folge, so ist das Gegenteil durch eine Änderung der Zusatzfolge zu erzielen. Belädt man die Blutkörperchen zuerst mit einem der uns hier beschäftigenden Fettstoffe außer Cholesterin und schickt nach kurzer Zeit irgendwelches Serum hinterdrein, so kommt es zu rapidester Zerstörung der Erythrocyten.

Dieses Beschleunigungsphänomen, zuerst von L. v. Liebermann beobachtet — wenn auch nicht ganz richtig gedeutet —, wurde dann von v. Dungern und Coca (l. c.) mit Bezug-

[1]) Izar, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 2, 1909.

nahme auf Ölsäure und ölsaures Na studiert, ferner von Friedemann und Sachs (l. c.). Eine genauere Untersuchung wurde dem Gegenstand von Fr. Sachs[1]) gewidmet. Dieser Autor hat gezeigt, daß statt der Ölsäure und verschiedener Seifen auch Lecithin-Agfa, aber nicht das unhämolytische Lecithol-Riedel, und statt des Serums auch Natronlauge, Kalilauge, Ammoniak, Soda (nicht $CaCl_2$ und mehrere andere Substanzen) sich zur Erzeugung des Phänomens eignen. Man kann also das Beschleunigungsphänomen mit Hilfe gewisser anorganischer Stoffe und mit Hilfe eines Serums auslösen.

a) Beschleunigung der Lipoidhämolyse durch anorganische Substanzen.

Wir wenden uns zu der Beschleunigung durch anorganische Substanzen. Fr. Sachs ist auf dem Wege elektrischer Untersuchungsmethoden zu der Ansicht gelangt, daß hierbei nur die OH-Ionen der genannten basischen Stoffe reagieren. In der Tat konnten wir die Blutkörperchen-Aufschwemmung sofort lackfarben machen, beluden wir sie an erster Stelle mit Ölsäure oder Lecithin und fügten nach wenigen Minuten $Ca(OH)_2$ oder Na_3PO_4 hinzu. Im allgemeinen haben wir uns der Natronlauge oder auch der Soda als zweiten Bestandteils bedient.

Je mehr Lipoid, um so weniger Alkali benötigt man, und umgekehrt, natürlich innerhalb engerer Grenzen. Von dem Lipoid kommt nur der Teil in Betracht, der in die Blutkörperchen eingedrungen ist bzw. sich an ihnen verankert hat. Digerierten wir Erythrocyten 5 Min. bei 37° mit wenig mehr als derjenigen Seifenmenge, die zur Auslösung der Beschleunigungserscheinung hinreicht, zentrifugierten und wuschen, so führte der Zusatz von NaOH zu dem gewünschten Erfolg, während der Abguß, mit neuen Blutkörperchen gemischt, von nachfolgender Natronlauge nicht komplettiert wurde. Zu gewöhnlichen Versuchen wurden von einer $^n/_{100}$-NaOH 0,5 für 0,5 Blk., 1,0 für 1,0 Blk. verwendet. Die Eigenhämolyse dieser Dosis ist minimal: 0,5 Blk. werden von 0,5 NaOH $^n/_{100}$ im Durchschnitt selbst nach 4 St. nur schwach gelöst, darunter haben

[1]) Fr. Sachs, diese Zeitschr. 12, 1908.

wir auch nach längerem Warten höchstens angedeutete oder gar keine Hämolyse gesehen.

Die Dosis der Ölsäure durfte nicht zu gering gewählt werden, durchschnittlich 0,6 bis 0,7 $^1/_{10000}$ für 1,0 Blk. und 0,5 NaOH $^n/_{100}$; von Lecithin-Agfa etwa bis 0,7 $^n/_{10000}$, ungefähr ebenso viel von Lecithin-Billon. Der Seife bedurfte es ungefähr 1,0 $^1/_{10000}$, mitunter etwas weniger. Fr. Sachs brauchte zu dieser Seifenmenge und 1,0 Ziegenblut nur 0,75 NaOH $^n/_{1000}$, um sofortige Auflösung herbeizuführen. Der Umfang der notwendigen Lipoidmengen ist manchen Schwankungen unterworfen. Vergleichen wir die eben genannten Mengen, so zeigt sich, daß Quantitäten unerläßlich sind, die nach nicht allzu langer Zeit allein lösen. Nur vom Lecithin reichen in Anbetracht seiner untergeordneten hämolytischen Kraft erstaunlich geringe Dosen hin. Denn die obigen Lecithinmengen führen — wenn überhaupt — erst nach einer sehr geraumen Zeit eine beschränkte Blutauflösung herbei. Hielten wir das Maß des Lecithins konstant und variierten das Quantum des Alkali, so genügten für 1,0 Blk. und 0,2 Lecithin-Billon $^1/_{1000}$ noch 0,2 Soda $^n/_{100}$.

Übrigens erwies sich statt eines Alkalis auch Säure geeignet. Leiteten wir Kohlensäure durch Kochsalzlösung, so nahm die Flüssigkeit blutauflösende Eigenschaft an. Geringe Mengen davon lösen nur sehr schwach und pflegen den Grad der Hämolyse, den sie gewöhnlich sehr rasch erreichen, auch bei längerem Stehen nicht zu überschreiten. Beschickten wir mit einer solchen kleinen Menge CO_2 Blutkörperchen, die nur wenig Lecithin oder Ölsäure empfangen hatten, so trat gleichfalls sofort totale Hämolyse ein. Das entspricht den Untersuchungen von Arrhenius[1]), der die Begünstigung selbst schwacher Säuren (wie Borsäure) bezüglich ihrer hämolytischen Wirkungen durch Lecithin beschrieben hat; über momentan eintretende Lyse berichtet er nicht.

Kehrt man nun die Reihenfolge um, d. h. erhält das Alkali den Vortritt vor dem Lipoid, oder mischt man beide vor ihrem Zusatz zum Blut, so ist für gewöhnlich der Vorgang einer im Augenblick sich abspielenden Hämolyse unter-

[1]) Arrhenius, Immunochemie, in Asher-Spiro, Ergebnisse der Physiol. 7, 1908.

bunden. Gleichwohl kann eine Beschleunigung, ja sogar eine solche, die nur mit dieser umgekehrten Versuchsanordnung zu ermöglichen ist, bis zu einem nennenswerten Grade sich geltend machen. Darauf wurden wir zuerst bei der Kombination: Seife und Soda aufmerksam.

Nr.	NaCl	Blk.	$^1/_{10\,000}$ Seife	$^n/_{10}$ Soda	37° 5 Min.	$^n/_{10}$ Soda	$^1/_{10\,000}$ Seife
			kurz gemischt				
1	2,7	0,5	0,3	—	+	0,5	—
2	2,8	„	—	0,5	+	—	0,2
3	2,8	„	0,2	0,5	—	—	—

1. Sofort eine Spur, nach 25 Min. total gelöst.
2. Nach 13 Min. total gelöst.
3. Nach $^1/_2$ St. keine Spur Lösung.

Es sei hierzu bemerkt, daß 0,5 Blk. von 0,5 Seife in der angegebenen Konzentration nach 50 Min., von 1,0 Soda $^n/_{10}$ nach 40 Min. vollständig aufgelöst waren. Genügten 0,3 Seife nicht, um die sofortige totale Hämolyse durch 0,5 Soda vorzubereiten, so vermochten doch 0,5 Soda mit nur 0,2 Seife als zweitem Glied die Blutauflösung schon im Laufe von 13 Min. zu vollenden. Die Mischung von Seife und Soda war am ungünstigsten. Ein ähnlicher Befund wurde mit kleineren Versuchsdosen erhoben.

Nr.	Blk.	NaCl	$^1/_{25\,000}$ Seife	$^n/_{20}$ Soda	37° 10Min.	$^n/_{20}$ Soda	$^1/_{25\,000}$ Seife	Total gelöst nach
1	0,5	2,5	0,5	—	+	0,5	—	60 Min.
2	0,5	2,5	—	0,5	+	—	0,5	40 „

Derselbe Versuch, mit 0,5 NaOH $^n/_{125}$ angesetzt, gab aber längere Lösungszeiten, und zwar mehr in Übereinstimmung mit einer Angabe von Fr. Sachs löste „NaOH—Seife" langsamer als „Seife—NaOH". Bei den angeführten Versuchen dürfte dem CO_2-Bestandteil der Soda eine Bedeutung beizumessen sein. — Für die Kombination Ölsäure–Soda und Ölsäure–NaOH in Mengen, die beim Zusammenwirken keine augenblickliche Hämolyse machten, blieb die Reihenfolge auf die Lösungszeit ohne Einfluß.

Diese Experimente („Seife–Soda" und „Soda–Seife") fielen bei Amboceptorgegenwart anders aus. Nicht allein, daß — auf Grund der Amboceptorwirkung — die Lösungszeiten sich etwas

in die Länge zogen; es ergab sich auch ein entgegengesetztes Resultat. Jetzt löste „Seife—Soda" nach 65 Min., „Soda—Seife" dagegen nach $2^1/_2$ St. Vielleicht ist noch zu erwähnen, daß auch die Sodahämolyse durch den Amboceptor etwas gehemmt zu werden scheint. Wie man sieht, liegen hier schwer entwirrbare Verhältnisse vor.

Eine nicht minder große Aufmerksamkeit verdient die Kombination von Lecithin und Alkali. Lecithin an erster gibt mit Soda oder Natronlauge an zweiter Stelle momentan totale Hämolyse. Unter Beibehaltung der Mengen veränderten wir wiederum die Reihenfolge und erhielten folgendes Ergebnis:

Nr.	Blk.	NaCl	$^n/_{20}$ Soda	$^n/_{125}$ NaOH	37° 10Min.	$^1/_{5000}$ Lecith. Billon	Total gelöst nach
1	0,5	2,5	0,5	—	+	0,5	7 Min. (sofort schwach)
2	0,5	2,5	—	0,5	+	0,5	15 „ „ „

0,5 Amboceptor $^1/_{400}$ ließen die Lösungszeit von 1 auf 14 Min. steigen, die von 2 blieb dieselbe, die sofortige Hämolyse durch „Lecithin—Alkali" beeinträchtigte der Amboceptor nicht. Ein anderes Mal dauerte mit Amboceptor die Hämolyse durch „NaOH—Lecithin" länger. (In der Wahl der Alkalimengen ließen wir uns nicht nur durch den Grad der basischen Reaktion, sondern auch von der hämolytischen Energie der Stoffe leiten.) — Wurden die mit NaOH digerierten Blutkörperchen abzentrifugiert, darauf Lecithin hinzugesetzt, dann verlief die Hämolyse nicht so schnell wie in dem letzten Versuch, außer mit einer größeren Dosis. Die Natronlauge war eben nicht von den Blutzellen gebunden.

Zur versuchsweisen Erklärung der eben geschilderten unverhältnismäßig raschen Hämolyse durch sehr wenig Soda oder NaOH an erster Stelle und sehr wenig Lecithin an zweiter (siehe letzte Tabelle!) muß hervorgehoben werden, daß die Reaktion für die Lecithinhämolyse nicht belanglos ist. Gewisse Mengen des von Michaelis und Skwirsky[1]) für Untersuchungen der Komplementhämolyse vorgeschlagenen sauren, nicht hämolytischen Gemisches von 4 Teilen NaH_2PO_4 und 1 Teil Na_2HPO_4 in bestimmten Konzentrationen verzögern die Hämolyse durch Lecithin. Dieses selbst reagiert, wie

[1]) Michaelis und Skwirsky, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 4, 1909.

man weiß, im allgemeinen sauer. Wir neutralisierten nun eine bestimmte Menge Lecithin mit NaOH unter Anwendung von Phenolphthalein als Indicator, und zwar, da es uns nicht auf die Herstellung des genauen Neutralpunktes für Phenolphthalein ankam, nicht in alkoholischer Lösung, sondern in NaCl. Einen andern Teil überalkalisierten wir und einen dritten Teil ließen wir unverändert. Auf diese Weise erhielten wir 3 Lösungen:

$^1/_{1000}$ Lecith. Billon	+ $^n/_{100}$ NaOH	+ NaCl		
10,0	0,5	9,4	= Lec. n =	Lecithin neutral
10,0	1,0	9,0	= „ a =	„ alkalisch
10,0	—	10,0	= „ =	„ sauer

Die hämolytischen Eigenschaften dieser Lösungen werden in der folgenden Tabelle einem Vergleich unterzogen.

Nr.	Lec.	Lec. n	Lec. a	NaCl	Blk.	
1	2,0	—	—	1,5	0,5	nach 3 Min. total gelöst
2	1,0	—	—	2,5	„	„ 7 „ „ „
3	0,5	—	—	3,0	„	„ 1 St. „ „
4	0,3	—	—	3,2	„	„ 1 „ schwach „
5	0,2	—	—	3,3	„	„ über 1 St. ungelöst
6	0,1	—	—	3,4	„	„ „ 1 „ „
1a	—	2,0	—	1,5	„	fast sofort total gelöst
2a	—	1,0	—	2,5	„	„ „ „ „
3a	—	0,5	—	3,0	„	nach 1 Min. „ „
4a	—	0,3	—	3,2	„	„ 1 St. stark „
5a	—	0,2	—	3,3	„	„ über 1 St. ungelöst
6a	—	0,1	—	3,4	„	„ „ 1 „ „
1b	—	—	2,0	1,5	„	fast sofort total gelöst
2b	—	—	1,0	2,5	„	„ „ „ „
3b	—	—	0,5	3,0	„	nach 1 Min. „ „
4b	—	—	0,3	3,2	„	„ 1 St. stark „
5b	—	—	0,2	3,3	„	„ über 1 St. ungelöst
6b	—	—	0,1	3,4	„	„ „ 1 „ „

Die Lecithin-Lösungen hatten also eine Konzentration von $^1/_{2000}$.

In der Tabelle treten drei Erscheinungen zutage:

1. Ein Alkalizusatz hat eine starke Beschleunigung der Lecithinhämolyse zur Folge (3, 3a, 3b, aber auch 1, 2, 1a, 2a, 1b, 2b).

2. Die Überalkalisierung gibt kein anderes Resultat als die Neutralisierung.

3. Der Alkalizusatz hat nur einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Hämolyse, keinen nennenswerten Einfluß auf die absolute Lösungsfähigkeit des Lecithins (5, 5a, 5b).

Wurde zu Röhrchen 5, 5a, 5b, nachdem in ihnen im Verlauf 1 St. keine Spur Lyse eingetreten war, NaOH zugesetzt, so erfolgte augenblickliche Auflösung; in 6, 6a, 6b nicht.

Ähnlich wie das Lecithin verhielt sich die Seife, die bei schwach saurer Reaktion (gegenüber Phenolphthalein) einen Alkalizusatz erhielt.

Wir wollen nicht unerwähnt lassen, daß es häufig nicht glückte, die Versuche in dieser Schärfe zu rekonstruieren.

Gehen wir jetzt zu einem Erklärungsversuch für die geschilderte Erscheinung über, so könnte als erster Gedanke der auftauchen, daß es sich um nichts weiter als eine Spaltung des Lecithinkomplexes und exzessive Verseifung handle. Daß mit dieser Vermutung eine erschöpfende und befriedigende Aufklärung wohl nicht ganz gegeben ist, dafür ist so manches beizubringen. Diese Anschauung würde besagen, daß wir in Wirklichkeit weit mehr Alkali hinzusetzen, als die Neutralisation an sich verlangt; zur bloßen Neutralisation der freien (Fett-) Säure würde schon viel weniger genügen; zu einer alkalischen Reaktion nach Hinzufügung des nächsten Tropfens Natronlauge käme es nur deshalb nicht, weil dieser einen Teil des intakten Lecithins aufspalte und verseife. Mit dieser Annahme ist indessen die Tatsache nicht vereinbar, daß in manchen Fällen schon eine Spur Alkali zur Herstellung des Neutralpunktes ausreicht. Auch die letzte Tabelle selbst weist mit ihren Ergebnissen nach einer anderen Richtung. Es widerspräche allen unseren Erfahrungen, würde eine Seife, von der 1,0 einer bestimmten Konzentration „fast sofort" und 0,5 „nach 1 Min." vollkommene Hämolyse zuwege bringt, in der Dosis von 0,3 erst nach 1 St. nur stark lösen. — Wir denken vielmehr an zwei Möglichkeiten. Es kann sein, daß die Seifenbildung, zu der es ja zwischen dem Alkali und der freien Fettsäure kommt, die Emulgierung des Lecithins verfeinert und damit dessen Lösungsintensität erhöht. Oder wir erinnern uns eines in einem früheren Abschnitt gefundenen Sachverhalts, der uns gezeigt hat, daß ein geringer Ölsäurezusatz die Lecithinhämolyse verzögert. Vielleicht trägt das Alkali durch die bloße Beseitigung

der freien (beigemengten bzw. infolge Zersetzung abgespaltenen) Fettsäure, die zum Teil wohl schwach hämolytische Palmitin- oder Stearinsäure sein wird, zu einer Steigerung der hämolytischen Eigenschaft des Lecithins bei. Möglicherweise ist mit beiden Eventualitäten zu rechnen. Nicht möchten wir dagegen annehmen, daß das Alkali durch Verseifung zwei neue hämolytische Körper entstehen läßt: Seife und ein des Ölsäurerestes beraubtes, stärker hämolytisches „Desoleolecithin", wie es v. Dungern und Coca[1]) beschrieben haben. — Eine genauere chemische Analyse aufzustellen unterließen wir mit Rücksicht auf die Unzuverlässigkeit, unter der gerade die Lecithinuntersuchungen zu leiden haben.

b) Beschleunigung der Lipoidhämolyse durch Serum.

Nachdem wir uns über die verschiedenen Beschleunigungserscheinungen bei der kombinierten Anwendung von Lipoiden und anorganischen Stoffen verbreitet haben, gehen wir nunmehr zu der wichtigeren Besprechung der rapiden Blutauflösung durch Lipoide und Serum über; wichtiger um deshalb, weil in diesem System der einen Komponente unter Umständen gar keine hämolytische Fähigkeit zukommt; es läßt sich nämlich auch mannigfaltig denaturiertes Eiweiß verwenden. Auf diesem Gebiete liegen die Verhältnisse insofern einfacher, als die Reihenfolge der Zusätze noch strenger geregelt ist, als wir es bei den anorganischen Stoffen gesehen haben. Da das Serum eine ausgesprochene Bindungsaffinität zu den Fettkörpern besitzt, so fängt das vorher zu den Erythrocyten zugesetzte Eiweiß die Lipoide ab und vereitelt auf diese Weise jeden weiteren Effekt, vor allem jede Beschleunigung.

Nehmen wir $^1/_2$ Stunde auf 58° erhitztes Menschenserum, zehnfach verdünnt, 1,0 ccm, so genügt vom Lecithin-Billon $^1/_{10\,000}$ noch 0,5 zur sofortigen Herbeiführung fast totaler Hämolyse; ebenso 0,8 Lecithin mit 0,5 Serum.

Fr. Sachs hat gezeigt, daß OH-Ionen des Serums für die Wirkung wahrscheinlich nicht in Frage kommen. Er sah keine Beeinträchtigung des Erfolges nach Ansäuern des Serums, nach Behandlung mit Äther eine Zunahme. Auch wir konnten mit schwach sauer reagierendem Meerschweinchenalbumin (vgl. oben

[1]) v. Dungern und Coca, diese Zeitschr. 12, 1908.

über Spaltung) das Phänomen auslösen; desgleichen mit alkoholgefälltem Serumeiweiß. Wir durften, unbeschadet seiner Wirksamkeit, dies gefällte Eiweiß mit Natronlauge auflösen und das Alkali mit Salzsäure neutralisieren. Mit Ammoniumsulfat ausgefälltes Eiweiß ist nicht zu verwenden, weil dies Fällungsmittel ein Hindernis für das Phänomen darstellt. Wir wollen kurz erwähnen, daß wir auch mit Eiweißarten verschiedener Konstitution Versuche gemacht haben. Es konnte das Phänomen z. B. mit Histon (aus Thymus mit Abderhaldens Methode gewonnen) ausgelöst werden; hier war aber eine OH-Wirkung nicht auszuschließen. Mit Syntonin (aus Muskel von Hammel und Meerschweinchen dargestellt) erhielten wir ein negatives Resultat. Ferner haben wir Nucleinsäure (aus Pankreas, Mensch) geprüft. Selbst unhämolytisch, erwies sie sich für das Phänomen ungeeignet, beschleunigt aber die Hämolyse einer sehr geringen Menge Lecithin ganz bedeutend. Die H-Ionen, die nach Arrhenius (l. c.) durch Lecithin eine beträchtliche Aktivierung erfahren, sind hierbei wohl kaum das wirksame Prinzip gewesen; denn eine entsprechende Menge HCl versagte ganz und gar. Entfernt dachten wir an das Verhältnis von Kieselsäure und Lecithin, das Landsteiner und Jagic[1]) beschrieben haben; durch aktives Komplement ließ sich aber das Lecithin nicht ersetzen, um mit Nucleinsäure Blutauflösung zu bewirken.

Wie verhalten sich nun die beiden Komponenten des gespaltenen Meerschweinchenkomplements? Wie oben können wir wiederum eine fundamentale Verschiedenheit konstatieren: nur das Albumin zerstört die Blutkörperchen nach vorangehendem Lipoidzusatz (Ölsäure, Seife, Lecithin) momentan, das Globulin nicht.

Diese Tatsache führt uns zu der Erörterung der Frage, in welcher Weise die Wirkung des Serums zu erklären ist. H. Sachs[2]) hat gelegentlich der Nachprüfung einer Angabe von Matthes gefunden, daß auch sublimatgehärtete Blutzellen durch Serum sofort aufgelöst werden. Er erklärt den Vorgang mit der großen Affinität des Eiweißes zum Quecksilberchlorid. Werden diese beiden Stoffe miteinander gemischt, so wird das $HgCl_2$ durch

[1]) Landsteiner und Jagic, Wiener klin. Wochenschr. 1904; Münch. med. Wochenschr. 1904.

[2]) H. Sachs, Münch. med. Wochenschr. 1902, 5.

das Eiweiß an einer Einwirkung auf die Erythrocyten verhindert (wie oben die Lipoide). Härtet man aber zuerst die Blutkörperchen mit Sublimat, so wird dieses von dem nachgeschickten Serum wieder herausgerissen und damit der Austritt des Hämoglobins veranlaßt. Unsererseits haben wir oben festgestellt, daß auch das Globulin die Seife bindet, und dennoch löst es lipoidbeladene Blutkörperchen nicht auf. (Nach Fr. Sachs ist auch Serumalbumin-Merck und Eieralbumin ungeeignet.) Möglicherweise enthält die Annahme einen Ausweg, daß der Grad der Affinität zwischen Lipoid und Eiweiß das Entscheidende ist: mag auch Globulin freie Seife binden; ist sie einmal in den Blutkörperchen verteilt, so reicht die Kraft des Globulins nicht mehr aus, die Seife wieder herauszureißen. Noch besser verständlich wäre es, warum das Globulin nicht mit Ölsäure oder Lecithin das Beschleunigungsphänomen zustande bringt; haben wir doch oben dargelegt, daß Globulin sich nicht mit Ölsäure oder Lecithin verbindet. Indessen, selbst auf 60° erhitztes Globulin ist nicht fähig, mit Ölsäure die Blutkörperchen momentan zu zerstören, obgleich es nach der Erhitzung Ölsäure zu binden in der Lage ist. Im übrigen kann es sich bei dem von H. Sachs untersuchten und dem Lipoid-Serum-Phänomen um wesensverschiedene Vorgänge handeln.

Der Vollständigkeit halber sollen noch einige Beobachtungen hier ihren Platz finden, die eigentlich nur den Erwartungen entsprechen. Wird eine zur Hervorbringung des extremen Beschleunigungsphänomens genügende Dosis Lecithin mit weniger als dem dritten Teil Cholesterin digeriert, so bleibt die Hämolyse auf Zusatz von NaOH aus. Dasselbe kann man erreichen, indem man das Lecithin an Albumin bindet. Auch an Globulin gebundene Seife ist nicht mehr imstande, mit nachfolgendem Albumin zu lösen. Den gleichen Erfolg hat Amboceptor-Beladung der Blutkörperchen, wenn eine geringe Seifendosis angewendet wird. Das konstatierten auch v. Dungern und Coca[1]), während es von Friedemann und Sachs (l. c.) nicht beobachtet wurde. Ölsäure und Seife werden dagegen auch bei dem Beschleunigungsphänomen in Übereinstimmung mit den vorher genannten Tatsachen nicht behindert.

---

[1]) v. Dungern und Coca, Berl. klin. Wochenschr. 1908, 7.

VI. Über die hämolytische Substanz im Handelslecithin.

Den Schluß unserer Ausführungen bilde anhangsweise ein Exkurs über die hämolytische Substanz im Handelslecithin. Es besteht nicht die Absicht, zu untersuchen, in welcher Gruppe des Lecithinmoleküls das aktive Prinzip zu erblicken ist. In dieser Hinsicht heben für die Aktivierung des Kobragiftes Kyes und Sachs (l. c.) die Fettsäurereste hervor, dem Cholinrest käme keine hämolytische Eigenschaft zu. Auch wir fanden wenigstens das Cholinchlorhydrat (Merck) 1:500 ganz unhämolytisch. Uns soll jedoch eine andere Frage beschäftigen. Bezüglich der Aktivierung des Kobragiftes ist die Ansicht weit verbreitet (besonders von Bang vertreten), daß das eigentliche Lecithin gar keine Rolle spiele, nur Beimengungen oder Spaltungsprodukte kämen in Betracht. Diese Anschauung wird auch für die Eigenhämolyse des Handelslecithins mannigfach geteilt. So macht Arrhenius (l. c.) in den Präparaten enthaltene freie Fettsäuren verantwortlich. Auch Bang (l. c.) beruft sich auf (wohl tatsächlich enthaltene) Verunreinigungen oder Zersetzungsprodukte. Ebenso glaubt Fr. Sachs das Beschleunigungsphänomen mit Lecithin und folgendem NaOH-Zusatz auf Seifenbeimengungen zurückführen zu müssen. Lecithol-Riedel versage. Dies ist in der Tat unhämolytisch. Es ist jedoch fraglich, ob das Lecithol-Riedel nicht hemmende Verunreinigungen enthält wie Cholesterin. Außerdem möchten wir auf die im Laufe unserer Darlegungen erhobenen Befunde hinweisen.

Gegen die Annahme, nur Seifenbeimengungen seien das Wirksame, spricht die Tatsache, daß Seife von Amboceptor in der Hämolyse verzögert, von Globulin gebunden wird, Lecithin nicht. Ferner hemmt Cholesterin wohl Lecithin, nicht aber Ölsäure oder Seife. Nun haben wir allerdings gesehen, daß auf diese beiden Lipoide sehr große Mengen Cholesterin einen gewissen Einfluß haben. Man könnte demnach meinen, eine Dosis Cholesterin, die im Verhältnis zu einer bestimmten Menge Lecithin nur als gering zu bezeichnen ist, stelle ein beachtenswertes Quantum dar im Verhältnis zu der kleinen im Lecithinpräparat enthaltenen Menge Ölsäure oder Seife. Es hat sich jedoch oben herausgestellt, daß der Lecithinhämolyse schon

durch den zehnten Teil Cholesterin eine ausgesprochene Verzögerung widerfährt. Nehmen wir an, der zehnte Teil des Fabrikats bestehe aus Seife oder Ölsäure, so wäre eine so starke Verzögerung durch Cholesterin nicht recht verständlich. Das Gesagte gilt auch für die Behinderung des Lecithins durch Cholesterin an dem Beschleunigungsphänomen mit NaOH. Endlich dieses Phänomen selbst! Hierfür reichen unter Umständen schon 0,5 Lecithin $^1/_{10000}$ aus, eine Quantität, die wir für Seife und Ölsäure kaum verringern dürfen. Es bliebe danach in einer abgewogenen Menge Lecithin für das Lecithin selbst fast kein Raum mehr. Wir verweisen schließlich auf die Beobachtung, daß die Lecithinhämolyse durch Ölsäure verzögert wird, eine Tatsache, die sich mit der Annahme der genannten Autoren nicht leicht vereinen läßt. Nun soll nicht geleugnet werden, daß Mischungen eine Rolle spielen können. Seife und Fettsäure können sich anders verhalten, wenn sie in reiner Form verwendet werden, als wenn sie z. B. mit selbst unhämolytischem Lecithin vermengt sind. Aber jedenfalls stehen die aufgezählten Momente der bedingungslosen Behauptung entgegen, die hämolytische Eigenschaft des Handelslecithins sei nur eine Wirkung der Beimengungen. Andererseits ist für manche Vorgänge, an denen das Lecithin beteiligt ist, vielleicht nicht so sehr dessen hämolytische Eigenschaft wie sein allgemeiner biologischer Charakter von Bedeutung.

Wir wollten mit den in der vorliegenden Abhandlung mitgeteilten Versuchen uns gewissermaßen das Rüstzeug schaffen, um der Frage nach der Bedeutung der Lipoide für die Komplementhämolyse näherzutreten. Dieses Problem selbst ist einer gesonderten Bearbeitung vorbehalten.

Zusammenfassung.

1. Lecithin- und Ölsäurehämolyse wird durch Immunamboceptor (von Kaninchen gegen Hammel) schwacher Konzentration nicht beeinträchtigt, Seifenhämolyse verzögert. Dabei spielt vielleicht Eiweißhemmung eine Rolle, z. T. wohl auch spezifische Amboceptorwirkung.

2. Lecithinhämolyse wird durch geringe Mengen Cholesterin gehemmt, Ölsäure- und Seifenhämolyse erst durch verhältnismäßig große Mengen und nicht ausgesprochen.

3. Die durch sog. Komplementspaltung gewonnenen aktiven Komponenten des Meerschweinchenserums verhalten sich verschieden:

a) in bezug auf die Lipoidbindung: „Albumin" („Endstück") bindet Seife, Lecithin und Ölsäure, „Globulin" („Mittelstück") bindet Seife stark, Lecithin nicht wesentlich, Ölsäure gar nicht;

b) in bezug auf die augenblickliche totale Blutauflösung durch hämolytische Lipoide und nachfolgenden Serumzusatz (Beschleunigungsphänomen): das Serum kann durch „Albumin" ersetzt werden, nicht durch „Globulin".

4. An der Hämolyse durch Handelslecithin sind wahrscheinlich nicht allein Beimengungen beteiligt, sondern wohl hauptsächlich das Lecithin selbst.

Zur Kenntnis der Chondroitinschwefelsäure.

Von

Kura Kondo, Tokio.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 16. April 1910.)

I.

Die Zusammensetzung der von C. Th. Moerner[1]) entdeckten, von Schmiedeberg[2]) eingehend untersuchten Chondroitinschwefelsäure des Knorpels ist nicht endgültig festgestellt.

Es geht dies schon daraus hervor, daß das Verhältnis der in ihr enthaltenen Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelatome sehr verschieden gefunden wurde.

Aus den bisher vorliegenden Analysen ergibt sich nämlich diese Relation, wie folgt:

Tabelle I.

Autor	Präparat	Angegebene Formel	C : N : S
Moerner	chondroitinschwefels. Kalium		13,09 : 1 : 0,88
Schmiedeberg	chondroitinschwefels. Kupfer, Präp. I	$C_{18}H_{25}CuNSO_{17} + H_2O$	16,00 : 1 : 0,88
„	chondroitinschwefels. Kupfer, Präp. II, III u. IV	$C_{18}H_{25}CuNSO_{17} + 3\,H_2O$	15,54 : 1 : 0,96

[1]) C. Th. Moerner, Skand. Arch. 1, 210, 1889.

[2]) Schmiedeberg, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 28, 354, 1891.

Tabelle I (Fortsetzung.)

Autor	Präparat	Angegebene Formel	C:N:S
Pons[1])	chondroitinschwefels. Natron, dargestellt nach Moerner		10,30:1:0,63
„	dasselbe, nach Schmiedeberg gereinigt		11,73:1:0,46
Schmiedeberg	neutrales chondroitinschwefels. Kalium + Chondroitinkalium	$3\,(C_{18}H_{24}K_2NSO_{17} + 2\,H_2O) + C_{18}H_{25}K_2NO_{14} + 2\,H_2O$	17,25:1:0,72
„	saures chondroitinschwefels. Kalium + Chondroitinkalium	$6\,(C_{18}H_{24}KNSO_{16} + {}^1/_2\,H_2O) + C_{18}H_{24}KNO_{13} + {}^1/_2\,H_2O$	17,07:1:0,79
„	Chondroitin	$C_{18}H_{27}NO_{14}$	17,62:1
„	Chondroitinbarium	$4[2(C_{18}H_{26}NO_{14})Ba] + C_{18}H_{27}NO_{14}$	17,69:1

Die Differenzen in den Analysenergebnissen der drei Untersucher sind überaus groß.[2]) Aber auch die von Schmiedeberg an zahlreichen, sorgfältig dargestellten Präparaten gewonnenen Zahlen zeigen unter sich nur unvollkommene Übereinstimmung. Nach Schmiedeberg enthält die Chondroitinschwefelsäure auf je ein Stickstoffatom einen Schwefelsäurerest. Dieser Forderung, die durchaus den später mitzuteilenden Erfahrungen entspricht, genügen jedoch von Schmiedebergs Analysen nur jene, die auf Präp. II, III und IV Bezug haben, und gerade diese Analysen ergeben den geringsten Kohlenstoffgehalt

(C:N:S = 15,54:1:0,96).

Die anderen Präparate weisen einen niedrigeren Schwefelgehalt auf, und zwar erhöht sich mit der Abnahme des Schwefelgehalts die relative Zahl der Kohlenstoffatome und nähert sich dabei dem im schwefelfreien Chondroitin gefundenen Atomverhältnis (C:N = 17,6:1).

Wie durch Moerner und Schmiedeberg erwiesen ist, erleidet die Chondroitinschwefelsäure bei der Darstellung durch

[1]) Pons, Archives intern. de physiol. 8, 393, 1909.

[2]) Dabei ist vielleicht der Umstand mit beteiligt, daß Schmiedebergs Stickstoffbestimmungen mit der Methode von Kjeldahl, jene von Pons nach Dumas ausgeführt sind.

Säure und Alkali leicht eine Zersetzung unter Abspaltung von Schwefelsäure. Schmiedeberg trägt diesem Umstand in den oben angeführten Formeln ausdrücklich Rechnung, unter der Voraussetzung, daß sich die Zersetzung auf die Abspaltung von Schwefelsäure beschränkt. Dadurch läßt sich aber, auch wenn man diese Voraussetzung gelten läßt, die beobachtete Verschiedenheit in dem Kohlenstoff-Stickstoffverhältnis nicht erklären, so daß es wünschenswert erschien, die Feststellung der empirischen Zusammensetzung der Chondroitinschwefelsäure durch erneute Untersuchungen an möglichst intaktem Material nochmals in Angriff zu nehmen.

Ich habe daher unter Leitung von Prof. Hofmeister zunächst versucht, ein Verfahren zur Darstellung der Chondroitinschwefelsäure auszuarbeiten, das deren genügende Reinigung gestattet, ohne die Intaktheit des Moleküls zu gefährden.

II.

Darstellung der Chondroitinschwefelsäure.

Moerner schlug behufs Isolierung der Chondroitinschwefelsäure — er benutzte Trachealknorpel vom Rind — folgenden Weg ein. Die zerkleinerten Knorpel wurden einige Tage mit 2 bis 5%iger Kalilauge bei Zimmertemperatur digeriert, die erhaltene Lösung durch Ansäuern und Gerbsäurezusatz in geeigneter Weise von eiweiß-, leim- und peptonähnlichen Substanzen befreit, die Gerbsäure mit Bleiacetat, das Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt und die Flüssigkeit behufs Entfernung der Alkalisalze dialysiert. Der Dialyserückstand wurde eingeengt, mit Alkohol und wenig Kochsalz gefällt, der grobfaserige Niederschlag nach Auswaschen mit Alkohol und Verreiben mit Äther getrocknet.

Dieses Verfahren hat Moerner später, als es sich ihm um den Nachweis der Chondroitinschwefelsäure in verschiedenen Geweben handelte, in zweckmäßiger Weise vereinfacht. (Verfahren II.) Das alkalische, wie oben gewonnene Extrakt wurde mit Essigsäure bis zu deutlich saurer Reaktion, dann mit einem Überschuß von Bariumcarbonat versetzt, aufgekocht, filtriert und das Filtrat nach Zusatz von ein wenig Bariumcarbonat auf dem Wasserbad zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit Wasser ausgekocht und das Filtrat mit Alkohol

gefällt, wobei chondroitinschwefelsaures Barium in einer für qualitative Reaktionen genügend reinen Form ausfiel.

Von diesem Verfahren hat in jüngster Zeit Pons Gebrauch gemacht. Er führte das so erhaltene Barytsalz durch Umsetzung mit Natriumcarbonat in das Natronsalz über, entfernte die Salze durch Dialyse und fällte unter Zusatz von wenig Kochsalz mit Alkohol. Der Niederschlag von Natriumchondroitinsulfat wurde mit Alkohol chlorfrei gewaschen, mit Äther behandelt und bei 110° getrocknet.

Schmiedeberg unterwirft die zerkleinerten Knorpel — er benutzte Nasenscheidewandknorpel vom Schwein — zunächst durch 24 bis 36 Stunden der Verdauung mit Pepsin und Salzsäure, löst das entstandene Pepto- und Glutochondrin in viel Kali und fällt entweder direkt chondroitinschwefelsaures Kali mit Alkohol oder er versetzt mit Kupferacetat und bringt durch Alkohol das Kupferkalisalz zur Abscheidung. Der Niederschlag wird durch wiederholtes Lösen in Wasser, Zusatz von Alkali, eventuell auch Kupferacetat und Fällen mit Alkohol gereinigt. Den letzten Rest albuminoider Substanzen entfernt Schmiedeberg, indem er stark mit Salzsäure ansäuert und allmählich mit Alkohol versetzt, bis ein geringer bleibender Niederschlag entstanden ist, nach dessen Entfernung das Filtrat frei von Albuminoidsubstanzen ist. Dieses wird mit Alkali und Alkohol nochmals gefällt.

Zur endgültigen Reinigung wurden dann noch verschiedene Verfahren benutzt, so Fällung des Kupfersalzes aus der mit Salzsäure und Kupferchlorid versetzten Lösung mit Alkohol, oder Fällung mit Bleiacetat, Zerlegung des Niederschlags mit Salzsäure und Fällung mit Alkohol.[1])

Ein Verfahren endlich, das sich Moerners zweitem Verfahren nähert, hat Oddi[2]) später in Schmiedebergs Institut ausgearbeitet. Die Knorpel werden 48 Stunden mit verdünnter Kalkmilch ausgezogen, die abkolierte Flüssigkeit wird angesäuert, durch Erwärmen auf 70 bis 80° auskoaguliert, das Filtrat eingeengt und nach Ansäuern mit Alkohol und Äther

---

[1]) Die auf diesem Wege gewonnenen Präparate I bis III bezeichnet Schmiedeberg als besonders rein.

[2]) Oddi, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 33, 384, 1894.

gefällt. Der Niederschlag wird mit Natriumcarbonat von Kalk befreit, mit Salzsäure neutralisiert, eingedampft und neuerdings nach Natronzusatz mit Alkohol gefällt. Falls die Lösung des Natronsalzes des Präparates schlecht filtriert, wird durch vorsichtigen Zusatz von Alkohol zu der alkalisch gemachten Lösung der Rest der Proteinstoffe beseitigt, die Darstellung wie oben zu Ende geführt. Von in dieser Art dargestellten Präparaten liegen keine Analysen vor, doch bemerkt Oddi, daß das so erhaltene Natronsalz 2 Atome Natrium enthielt.

Das von mir ausgearbeitete Verfahren ging von Moerners sehr bequemer zweiter Methode aus. Nur wurde statt Alkohol zur Fällung Eisessig benutzt. Wie Moerner schon in seiner ersten Mitteilung bemerkt, wird die Chondroitinschwefelsäure durch Eisessig gefällt. Da nun Eisessig ein gutes Lösungsmittel für fast alle Arten von Proteinstoffen ist, namentlich aber auch Glykogen, dessen Anwesenheit im Knorpel[1]) bei der Darstellung der Chondroitinschwefelsäure zu berücksichtigen ist, nicht niederschlägt, so war auf diesem Wege eine rasche Reinigung zu erwarten.

Doch war es notwendig zunächst sicherzustellen, ob nicht Eisessig auf Chondroitinschwefelsäure spaltend einwirkt. Einschlägige Versuche ergaben, daß der Zusatz eines bestimmten Volums Eisessig zu einer Lösung des Natronsalzes bei Zimmertemperatur ungefähr dieselbe hydrolytische Wirkung ausübt wie der Zusatz des gleichen Volums verdünnter Salzsäure. Die Spaltung vollzieht sich jedoch sehr langsam. So war nach Zusatz des gleichen Volums Eisessig nach 6 bzw. 24 Stunden nur eine minimale Abspaltung von Schwefelsäure nachweisbar; in den ersten Stunden fehlte sie ganz.[2])

Da ein Überschuß von Eisessig die Chondroitinschwefelsäure (wahrscheinlich als saures Salz) ausfällt, so ist damit der hydrolytischen Wirkung bei hohen Konzentrationen eine Grenze gesteckt. Bei der Darstellung mittels Eisessig ist somit darauf Gewicht zu legen, daß die Chondroitinschwefelsäure nicht zu lange in gelöster Form der Einwirkung der Essigsäure

---

[1]) Vgl. Pflüger, „Das Glykogen", 2. Aufl. 1905, S. 162.

[2]) Beim Kochen mit Eisessig war sie bereits nach $^1/_2$ Stunde nachweisbar.

ausgesetzt bleibt. Demgemäß ist es zweckmäßig, den durch Eisessig erzeugten Niederschlag nach dem Lösen in Wasser möglichst bald wieder mit Eisessig oder Alkohol zu fällen oder mit Alkali zu neutralisieren.

Bei meinen oft wiederholten Darstellungen bin ich schließlich bei einem Verfahren stehen geblieben, das von Moerners zweiter Methode ausgehend in relativ kurzer Zeit zu proteinfreien Präparaten führt.

Ich benutzte wie Schmiedeberg Nasenscheidewandknorpel vom Schwein. Die fein zerkleinerten Knorpel wurden mit 2 Teilen einer 2%igen Kalilösung 2 Tage bei Zimmertemperatur digeriert, dann wurde mit 3 Teilen Wasser verdünnt, durch Leinwand abkoliert und der Rückstand nochmals der gleichen Behandlung unterworfen; die gesamte alkalisch reagierende Extraktionsflüssigkeit wurde mit Essigsäure sauer gemacht, mit einem Überschuß von Bariumcarbonat versetzt, aufgekocht, dann mehrere Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung wurde der Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt, und die Flüssigkeit, falls sie bei der Hellerschen Probe noch Eiweißspuren erkennen ließ, nochmals auskoaguliert. Die stark eingeengte Lösung ließ ich nun tropfenweise unter Umrühren in einen hohen Zylinder mit 2 bis 3 Volumen Eisessig einfließen, wobei die Chondroitinschwefelsäure als lockerer, flockiger, unter dem Mikroskop aus äußerst feinen Fasern bestehender Niederschlag ausfiel. Dieser wurde an der Saugpumpe abfiltriert, in möglichst wenig Wasser gelöst und neuerdings in Eisessig einfließen gelassen. Das Umfällen mit Eisessig wurde bis zum Verschwinden jeder Andeutung von Biuretreaktion wiederholt, was meist sehr frühzeitig z. B. durch die zweite Umfällung erreicht wurde. Dann wurde der Niederschlag scharf abgesaugt, in Wasser gelöst, die Lösung mit Natron- oder Kalilauge, je nachdem welches Salz man darstellen wollte, neutralisiert, bei niederer Temperatur auf ein kleines Volum gebracht und mit 95%igem Alkohol gefällt. Durch wiederholtes Umfällen und nachträgliches Auskochen mit 95%igem oder absolutem Alkohol wurde das anhaftende Natriumacetat oder, was noch leichter gelingt, Kaliumacetat entfernt. Das völlig weiße pulverförmige Präparat wurde dann mit Äther gewaschen und im Vakuumexsiccator zur Trockne gebracht.

III.

Präparate und Analysen.

Von den Präparaten, deren Analysen unten folgen, ist das Kalisalz C genau nach diesem Verfahren direkt aus Knorpel dargestellt.

Präp. A ist nach Moerners zweitem Verfahren gewonnen. Das zunächst erhaltene Bariumsalz wurde, wie das auch Pons getan hat, durch Umsetzung mit Sodalösung in das Natronsalz übergeführt, mit Alkohol gefällt und das Umfällen mit Alkohol bis zum Verschwinden jeder Spur von Biuretreaktion wiederholt. (Wenn Alkohol auch in der konzentrierten Lösung nur eine Trübung erzeugt, setze ich etwas Natriumacetat hinzu, worauf die Fällung typisch eintritt.) Zum Schluß wurde das Präparat durch Auskochen mit 95%igem und absolutem Alkohol von anhaftendem Natriumacetat befreit.

Präp. B wurde aus A durch wiederholte Fällung mit Eisessig dargestellt.

Präp. D (Kupfersalz) habe ich aus chondroitinschwefelsaurem Natrium, das nach der Eisessigmethode dargestellt war, der Angabe Schmiedebergs[1]) folgend gewonnen, indem ich das Natronsalz mit wenig Salzsäure löste, der konzentrierten Flüssigkeit einen Überschuß von fast gesättigter Kupferchloridlösung hinzusetzte, filtrierte und das Filtrat mit Alkohol fällte. Der Vorschrift gemäß wurde die Behandlung bis zur Entfernung des Natriums wiederholt. Das chlorfrei gewaschene Präparat wurde, als es das Filter zu verstopfen begann, durch Zentrifugieren und Dekantieren von der Flüssigkeit getrennt, mit absolutem Alkohol und mit Äther gewaschen und dann zur Trockne gebracht. Es wurde als blaugrünes, staubförmiges Pulver erhalten.

Präp. E wurde bei dem Versuche erhalten, die Chondroitinschwefelsäure alkalifrei zu gewinnen.

5 g von Präp. A wurden in wenig Wasser gelöst, mit Salzsäure versetzt und die Lösung in das 3fache Volum Eisessig einfließen gelassen. Da der Niederschlag trotz Anwesenheit

---

[1]) a. a. O., S. 12.

von freier Salzsäure noch viel Natron enthielt, wurde die Eisessigfällung aus salzsäurehaltiger Lösung noch einigemal wiederholt. Doch gelang es nicht auf diesem Wege das Natrium zu entfernen, ebensowenig bei weiterem siebenmaligem Umfällen mit Eisessig allein. Zum Schluß wurde zweimal mit Alkohol umgefällt und der Niederschlag im Soxhletapparat mit Äther extrahiert. (Um die extrahierte Essigsäure zu binden, war dem Äther im Destillationskolben etwas Kali zugefügt.)

Das Präparat bot ein etwas anderes Aussehen dar als die untersuchten Natron- und Kalisalze, es war mehr durchscheinend, gelblich-bräunlich gefärbt, war auch keine reine Chondroitinschwefelsäure, da es, wie die Analyse lehrte, einerseits immer noch Natrium enthielt, andererseits bloß die Hälfte des ursprünglichen Schwefelgehalts aufwies.

Die Präparate kamen sämtlich vakuumtrocken zur Analyse. Die Kohlenstoffbestimmungen sind unter Verwendung von Bleichromat, die Stickstoffbestimmungen zumeist nach Dumas ausgeführt. Der bei einfacher Veraschung erhaltene Rückstand bestand ganz aus dem Sulfat des betreffenden Alkalis.

Präp. A. Natriumsalz der Chondroitinschwefelsäure (nach Moerners II. Methode):

I. 0,1037 g Subst.: 2,3 ccm N, 20°, 714 mm.
II. 0,1257 g „ 0,0520 g $BaSO_4$.
III. 0,1224 g „ 0,0319 g Na_2SO_4.
IV. 0,1190 g „ 0,0317 g Asche (Na_2SO_4).
V. 0,1166 g „ 0,1438 g CO_2, 0,0519 g H_2O.

Präp. B. Natriumsalz der Chondroitinschwefelsäure (Eisessigmethode):

I. 0,1292 g Subst.: 0,1513 g CO_2, 0,0530 g H_2O.
II. 0,1050 g „ 2,4 ccm N, 18°, 713 mm.
III. 0,1142 g „ 0,0476 g $BaSO_4$.
IV. 0,1362 g „ 0,0361 g Na_2SO_4.
V. 0,1356 g „ 0,0362 g Na_2SO_4.
VI. 0,1016 g „ 0,1212 g CO_2, 0,0425 g H_2O.

Präp. C. Kaliumsalz der Chondroitinschwefelsäure (Eisessigmethode):

I. 0,2086 g Subst.: 0,2358 g CO_2, 0,0793 g H_2O.
II. 0,1000 g „ 2,3 ccm N, 19°, 723 mm.
III. 0,1950 g „ 0,0587 g K_2SO_4.
IV. 0,1211 g „ 0,0464 g $BaSO_4$.

Präp. D. Kupfersalz der Chondroitinschwefelsäure (Eisessigmethode):

I. 0,1339 g Subst.: 0,1492 g CO_2, 0,0646 g H_2O.
II. 0,1496 g „ 4,0 ccm N, 20°, 714 mm.
III. 0,1452 g „ 0,0574 g $BaSO_4$.
IV. 0,1452 g „ 0,0264 g CuO.

Präp. E. Chondroitinschwefelsäure + Chondroitin.
I. 0,1098 g Subst.: 0,1600 g CO_2, 0,0560 g H_2O.
II. 0,1439 g „ 3,8 ccm N, 18°, 715 mm.
III. 0,3000 g „ 6,65 ccm $^n/_{10}$-Säure.
IV. 0,1217 g „ 0,0304 g $BaSO_4$.
V. 0,1234 g „ 0,1820 g CO_2, 0,0674 g H_2O.
VI. 0,0944 g „ 0,0037 g Asche (Na_2SO_4).

Nachstehend sind die gefundenen Prozentwerte übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle II.

	A	B	C	D	E
C %	33,62	32,54 31,93 → 32,24	30,82	30,39	39,73 40,23 → 39,98
H %	4,98	4,59 4,68 → 4,63	4,25	5,40	5,71 6,11 → 5,91
N %	2,40	2,48	2,52	2,88	2,88 3,10 → 2,99
S %	5,74	5,72	5,26	5,43	3,43
Metall %	(Na) 8,45 8,62 → 8,53	(Na) 8,60 8,66 → 8,63	(Ka) 13,52	(Cu) 14,52	(Na) 1,27
O %	44,73	46,30	43,63	41,38	46,42

Die durchanalysierten Präparate gestatten ein Urteil über das Verhältnis der in der Chondroitinschwefelsäure vertretenen Elemente. Die nachfolgende Tabelle III gibt eine Zusammenstellung der aus meinen Analysen sich ergebenden Atomzahlen. Dabei ist der Schwefelgehalt als Einheit zugrunde gelegt, weil sich beim Schwefel analytische Fehler weniger geltend machen als beim Stickstoff, aber mehr noch deshalb, weil der Schwefel als der labilste Bestandteil der Chondroitinschwefelsäure am ehesten einen Maßstab für die Intaktheit des Moleküls abgibt. Zum Vergleich stelle ich die von Moerner ermittelten Werte daneben, sowie jene, die sich aus Schmiedebergs Präparaten II, III und IV und dem 1. Präparate von Pons berechnen. Es sind das die Präparate, in denen augenscheinlich eine Schwefelabspaltung durch das Darstellungsverfahren nicht eingetreten ist.

Tabelle III.

	1	2	3	4	5	6	7
	Kondo				Moerner	Schmiedeberg	Pons
	A	B	C	D	Nr. 5 [1])	II, III u. IV	1.
C	15,65	15,06	15,66	14,96	14,89	16,25	16,29
H	27,62	25,76	25,71	31,65	24,55	28,18	34,38
N	0,96	0,99	1,09	1,21	1,14	1,04	1,58
S	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
O	15,62	16,22	16,63	15,27	16,01	17,70	16,90
Metall	(Na) 2,07	(Na) 2,10	(K) 2,11	(Cu) 1,35	(K) 1,02	(Cu) 0,90	(Na) 1,95

Aus diesen Zahlen läßt sich für die intakte Chondroitinschwefelsäure folgendes entnehmen:

1. Stickstoff und Schwefel sind darin in gleicher Atomzahl vertreten (1, 2, 3, 6, annähernd auch in 4 und 5), wie dies auch Schmiedeberg annimmt.

2. Die neutralen Alkalisalze enthalten zwei Atome Metall auf ein Atom Schwefel (1, 2, 3, 7),[2]) was mit Oddis Angabe übereinstimmt.

3. Auf je ein Schwefel- und Stickstoffatom entfallen 15, höchstens 16 Kohlenstoffatome (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).[3]) Schmiedebergs Formel verlangt 18.

4. Die Zahl der Sauerstoffatome ist meist etwas höher als jene der Kohlenstoffatome (2, 3, 4, 5, 6, 7).

Danach hat man nach Ersatz der Metallatome durch Wasserstoff die Auswahl zwischen einer Anzahl von Formeln mit 15 oder 16 Kohlenstoffen und 15 bis 18 Sauerstoffen, wozu noch kommt, daß aller Wahrscheinlichkeit nach das Molekulargewicht doppelt so groß, vielleicht noch größer ist, so daß die endgültige Formel z. B. ebenso gut C_{30} oder C_{31} enthalten könnte.

Es ist nicht zu erwarten, daß sich bei einer so hoch zusammengesetzten amorphen und auch nicht durch den Schmelz-

[1]) Moerner hat nur ein saures Kaliumsalz (Nr. 5) durchanalysiert. In der mir zugänglichen Mitteilung ist nur die Kaliumzahl und der Prozentgehalt der übrigen Elemente nach Abzug des Kaliums angegeben. Die oben angeführten Werte sind auf Grund dieser Angaben für das Kaliumsalz berechnet.

[2]) Auch die von Moerner in einem neutralen Barytsalze ermittelte Bariumzahl spricht für diese Auffassung.

[3]) Das Präparat E, das einen Teil seines Schwefels eingebüßt hatte, enthält 31 C auf 2 N und 1 S.

punkt charakterisierten Substanz — mag die Reindarstellung noch so sorgfältig geschehen — die Formel durch die Analyse wird endgültig ermitteln lassen. Hier kann nur der von Schmiedeberg betretene Weg, die Untersuchung der Spaltungsprodukte, weiter führen. Für Überschlagsrechnungen dürfte die vorläufige Annahme der einfachen Formel $C_{15}H_{27}NSO_{16}$ genügen.

IV.

Einiges über die Eigenschaften der Chondroitinschwefelsäure.

Da die von mir dargestellten Präparate der Chondroitinschwefelsäure wider Erwarten nicht der Formel von Schmiedeberg entsprachen, war es nötig, darauf zu achten, ob sie nicht auch in anderer Beziehung von Schmiedebergs Substanz abweichen. Ich habe indes eine solche Abweichung nicht beobachtet.

Doch bedarf das Verhalten meiner Substanz gegenüber gewissen Kohlenhydratreaktionen einer Erwähnung, da in dieser Richtung aus neuerer Zeit sich schroff widersprechende Angaben vorliegen.

Orgler und Neuberg[1]) geben an, daß die von ihnen nach Schmiedebergs Verfahren dargestellte Chondroitinschwefelsäure bei sorgfältiger Reinigung keine Orcin- und Phloroglucinreaktion gibt, während S. Fränkel[2]) diese Reaktionen mit nach Oddi dargestellten Präparaten konstant erhielt, ebenso Pons[3]) mit seiner nach Moerners zweitem Verfahren dargestellten Substanz.

Ferner konnten Orgler und Neuberg bei der Destillation der Chondroitinschwefelsäure mit Salzsäure Furfurol nicht in irgend nennenswerter Menge nachweisen, während Pons mit dem Tollensschen Verfahren daraus 6,56% erhielt. Um festzustellen, ob etwa die Chondroitinschwefelsäure bei dem Verfahren von Schmiedeberg die Furfurol liefernde Gruppe einbüßt, unterwarf Pons ein nach Moerner dargestelltes Präparat nachträglich der Verdauung und dem Kupferoxyd-Kaliverfahren; die so gewonnene Substanz, die der Analyse zufolge einen großen

[1]) Orgler und Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 407, 1902.

[2]) S. Fränkel, Festschrift f. A. Lieben, 1906, S. 541; Liebigs Ann. 351, 344.

[3]) Pons, a. a. O.

Teil ihrer Schwefelsäure verloren hatte, lieferte nichtsdestoweniger 6,90% Furfurol.

Die von mir nach der Eisessigmethode dargestellten Präparate gaben sehr starke Orcin- und Phloroglucinreaktion, besonders wenn der Anstellung der Probe die Spaltung (Kochen mit nicht zu verdünnter Säure bis zur leichten Braunfärbung) vorausgeschickt wurde. Auch war es nicht schwierig, durch Kochen mit Säure Furfurol zu erhalten.

Ferner gaben meine Präparate die Naphthoresorcinreaktion, wie dies für Chondroitinschwefelsäure schon von Mandel und Neuberg[1]) und Pons angegeben worden ist.

Bei anhaltendem Kochen mit überschüssigem Barythydrat bis zur völligen Abspaltung der Schwefelsäure erhielt ich ein in Wasser lösliches, durch Alkohol fällbares Barytsalz, das seiner Zusammensetzung nach dem von Schmiedeberg dargestellten chondronsauren Barium nahestand.

Nach Pons gibt Chondroitinschwefelsäure bei langem Stehen mit essigsaurem Phenylhydrazin und Salzsäure ein osazonähnliches Produkt, das nach der ziemlich umständlichen Isolierung und Reinigung in nadelförmigen, äther- und petrolätherlöslichen Krystallen vom Schmelzpunkt 143 bis 144° erhalten wird, sich aber von allen bekannten Osazonen durch einen auffällig niedrigen Sauerstoffgehalt unterscheidet.

Ich kann auf Grund eines Versuches, der mit dem nach dem Eisessigverfahren gewonnenen Natriumsalz angestellt war, das Auftreten des osazonähnlichen, bei 143° schmelzenden Körpers bestätigen. Die Ausbeute war, wie bei Pons, überaus gering. Ich habe versucht, auf dem von Pons eingeschlagenen Weg zu einem analogen Produkt aus Xylose zu gelangen, was in der Tat gelang. Der Schmelzpunkt war derselbe. Doch war auch hier die Ausbeute so gering, daß vorläufig von einer weiteren Verfolgung des Gegenstandes abgesehen wurde.

Die chondroitinschwefelsauren Salze sind optisch aktiv, und zwar linksdrehend.

V.

Über Benzoylchondrosine.

Pons hat in jüngster Zeit versucht, das bei der Spaltung der Chondroitinschwefelsäure entstehende Chondrosin durch Über-

[1]) J. A. Mandel und C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 148, 1908.

führung in Benzoylprodukte von den übrigen Spaltungsprodukten zu trennen. Er erhielt beim Benzoylieren des Spaltungsgemenges nach Baumann ein in Alkali unlösliches Produkt, das er durch Waschen mit Wasser, Lösen mit Alkohol, neuerliches Fällen mit Wasser, Trocknen und Erschöpfen mit Petroläther reinigte. Die Substanz wurde dann aus Alkohol in Form eines Sirups erhalten, der unter Wasser hart wurde, ohne krystallinische Struktur anzunehmen. Die bei verschiedenen Darstellungen erhaltenen Präparate zeigten wechselnden Schmelzpunkt (50° bis 96°) und enthielten 29 bis 32 Kohlenstoffe auf 1 Stickstoff. Vermutlich lagen hier Gemenge von Benzoylprodukten (z. B. eines Di- und eines Tribenzoylchondrosins) vor. Auch ist zu erwägen, daß die Entfernung beigemengter Benzoesäure aus ähnlichen Produkten große Schwierigkeiten bereiten kann.

Bei meinen Versuchen ging ich darauf aus, eine maximale Benzoylierung zu erreichen und nur Produkte von konstantem Schmelzpunkt zur Analyse zu bringen.

Die Spaltung der Chondroitinschwefelsäure erfolgte durch 3stündiges Kochen mit 2 bis 5%iger Salzsäure. Die Lösung wurde im Vakuum eingeengt und das Chondrosin durch Alkohol und Äther gefällt. Die Benzoylierung wurde mit einem großen Überschuß von Benzoylchlorid im Schüttelapparat vorgenommen, und es wurde darauf geachtet, daß die Flüssigkeit stets stark alkalisch blieb und keine Erwärmung eintrat. Eventuell wurde gekühlt. Der bräunliche, klebrig flockige Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen, dann in Chloroform gelöst und daraus mit Petroläther wieder gefällt.

Der Niederschlag zeigte getrocknet einen Schmelzpunkt von 123°. Er wurde wiederholt aus Chloroform und dann auch aus Benzol mit Petroläther umgefällt, wobei der Schmelzpunkt bis 142° stieg.

Schließlich wurde die Substanz in warmem Methylalkohol gelöst, von einem schwerer löslichen Teil abfiltriert, das Filtrat zur Trockene gebracht, der Rückstand nochmals mit Benzol aufgenommen und mit Petroläther gefällt, wodurch der Schmelzpunkt bis 149° stieg. Eine weitere Erhöhung des Schmelzpunktes war nicht zu erreichen.

Amorphes, weißes, nur wenig bräunliches Pulver, unlöslich in Wasser und Petroläther, löslich in Alkohol und warmem Methylalkohol, sehr leicht löslich in Aceton, Essigäther, Chloro-

form, Benzol, Toluol, aus diesen Lösungsmitteln durch Petroläther fällbar. Auch in Eisessig und Pyridin löslich, daraus durch Wasserzusatz fällbar.

Alkali verseift leicht, während Salzsäure nur schwach angreift. Bei längerem Kochen mit Fehlingscher Lösung tritt Reduktion ein.

Auf dem Platinblech erhitzt, schmilzt die Substanz, entwickelt Benzoesäuredämpfe, verbreitet dann Geruch nach Caramel und verbrennt, ohne Asche zu hinterlassen.

Die Analyse der vakuumtrockenen Substanz ergab:

0,1457 g Substanz: 0,3456 g CO_2, 0,0624 g H_2O,
0,0710 g „ 1,0 ccm N, 16°, 716 mm.

Diese Zusammensetzung stimmt gut zu einem 5fach benzoylierten Chondrosin $[C_{12}H_{16}(C_7H_5O)_5NO_{11}]$.[1])

Pentabenzoylchondrosin, $C_{47}H_{41}NO_{16}$.
Berechnet: C 64,43, H 4,72, N 1,60.
Gefunden: C 64,69, H 4,79, N 1,55.

Um die Zahl der eintretenden Benzoylgruppen noch auf einem anderen Wege zu bestimmen, habe ich auch das entsprechende Brombenzoylprodukt analysiert.

Die Darstellung geschah durch Schütteln der alkalischen Lösung des Chondrosins mit Brombenzoylchlorid in derselben Weise wie beim Benzoylchondrosin. Auch die Behandlung des ausgefallenen Niederschlags mit Wasser, die Umfällung aus Chloroform und Benzol mit Petroläther erfolgte in gleicher Weise. Der Schmelzpunkt der so gewonnenen Substanz lag etwa bei 100 bis 107°, war aber nicht konstant. Durch Behandlung mit warmem Methylalkohol ließ sich eine kleine Menge eines darin gut löslichen Körpers vom Schmelzpunkt 112° entfernen, während der ungelöst gebliebene größere Anteil bei 118° schmolz und auch den Schmelzpunkt bei weiterer Behandlung mit Methylalkohol nicht mehr änderte.

Die Analyse des bei 118° schmelzenden, vakuumtrockenen Körpers ergab:

0,0910 g Substanz: 0,0686 g Ag Br.
Pentabrombenzoylchondrosin, $C_{47}H_{36}Br_5NO_{16}$.
Berechnet: Br 31,48.
Gefunden: Br 32,08.

[1]) Vorausgesetzt, daß das Chondrosin das Molekulargewicht der einfachen von Schmiedeberg angegebenen Formel $C_{12}H_{21}NO_{11}$ besitzt. Orgler und Neuberg schließen aus Molekulargewichtsbestimmungen auf eine 2 bis 3fach so hohe Zahl.

Danach scheint es, daß das Chondrosin bei dieser Form der Benzoylierung nicht über 5 Benzoylgruppen aufzunehmen vermag.

Wenn Pons aus dem Umstand, daß seine Benzoylpräparate nicht zu einem benzoylierten Chondrosin stimmen, den Schluß zieht, daß wahrscheinlich Schmiedebergs Chondrosinformel unrichtig ist, so ist dem schwerlich beizustimmen. Meine Resultate sprechen vielmehr, ebenso wie die von S. Fränkel untersuchten basischen Kupfersalze des Chondrosins, für deren Richtigkeit.

Bemerkt sei noch, daß die Unlöslichkeit der Benzoylprodukte in Alkali gegen die Säurenatur des Chondrosins spricht. Die von Schmiedeberg beobachtete leicht zersetzliche Bariumverbindung, ebenso wie die erwähnten basischen Kupfersalze lassen sich als den Saccharaten entsprechende Verbindungen auffassen.

Der Versuch, Verbindungen des Chondrosins mit Phenylisocyanat und Benzolsulfochlorid zu erhalten, war erfolglos. Hingegen reagierte es mit Naphthalinsulfochlorid, doch wurde das Produkt noch nicht näher untersucht.

Die Bildungsstätte der Uraminosäuren.

Von

Peter Philosophow, St. Petersburg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 16. April 1910.)

Um die Entstehung des Harnstoffes im Tierkörper aus Eiweiß und seinen Spaltungsprodukten zu erklären, hat man bekanntlich verschiedene Annahmen gemacht. So soll sie zustande kommen:

1. durch die Anlagerung von Cyansäure an Ammoniak [Hoppe-Seyler und Baumann[1]), Salkowski[2])];

2. durch die Anhydrierung von Ammoniumcarbonat [Schmiedeberg[3])], eventuell über Ammoniumcarbamat [Drechsel[4])];

3. endlich durch eine oxydative Synthese von Ammoniak mit einem Aminosäurerest $CONH_2$ [Hofmeister[5])[6])].

Diese Vorstellungen stützen sich ausschließlich auf die Analogie des physiologischen Prozesses mit außerhalb des Tierkörpers beobachteten chemischen Vorgängen. Die Möglichkeit, in Zukunft an Stelle der bloßen Analogie endgültige Beweise zu setzen, hängt

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 7, 34, 1874.

[2]) Centralbl. f. med. Wiss. 1875, 913.

[3]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 8, 1, 1877.

[4]) Ber. d. Kgl. sächs. Ges. d. Wissensch., Mathem.-physik. Kl. 1875, 172.

[5]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 37, 426, 1896.

[6]) Die fermentative Umwandlung der Guanidingruppe des Arginins zu Harnstoff [Drechsel*), Kossel] darf hier, weil nur für einen kleinen Teil des Eiweißstickstoffes zutreffend, außer Betracht bleiben.

*) Ber. d. Kgl. sächs. Ges. d. Wissensch., Mathem.-physik. Kl. 1890, 1. August.

davon ab, ob es gelingt, die vitale Harnstoffbildung in ihren Zwischenstufen zu verfolgen. Für eine solche Verfolgung scheint die Bildung der Uraminosäuren besonders günstige Bedingungen zu bieten, weil sich hier der im übrigen der Harnstoffbildung ganz ähnliche chemische Vorgang besonders einfach gestaltet, da er sich auf die Anlagerung einer $CONH_2$-Gruppe an die Aminosäure beschränkt.

Die Bildung von Uraminosäuren hat man in Fällen nachgewiesen, wo die vitale Oxydation der betreffenden Aminosäuren auf Hindernisse stößt, so bei Taurin [Salkowski[1])], m-Aminobenzoesäure [Salkowski[2]), Cohn[3])], o- und p-Aminosalicylsäure [Nencki und Pruszinski[4])], Sulfanilsäure [Ville[5])], Phenylalanin [Dakin[6])], und unter weiterer Umwandlung der Uraminosäure in das zugehörige Anhydrid beim Tyrosin [Blendermann[7])].

Sollte von dieser im Organismus ablaufenden Synthese für die Theorie der Harnstoffbildung experimentell Nutzen gezogen werden, so mußte zunächst der Ort der Synthese festgestellt werden. Zwar war auf Grund der Analogie anzunehmen, daß die Uraminosäuresynthese, die gewissermaßen eine auf halbem Wege stehen gebliebene Harnstoffsynthese darstellt, ebenso wie letztere ihren Sitz in der Leber haben dürfte. Ein Beweis dafür lag aber nicht vor. Ich folgte daher gern einer Aufforderung von Prof. Hofmeister, durch Versuche an der künstlich durchbluteten Leber die Richtigkeit dieser Vermutung zu prüfen.

Der Versuchsplan ging ursprünglich dahin, der künstlich durchbluteten Leber Taurin zuzuführen und in Blut und Gewebe dann die Taurocarbaminsäure aufzusuchen. Für die Wahl des Taurins war der Umstand maßgebend, daß seine Anwesenheit ebenso wie die seiner Uraminosäure an dem Schwefelgehalt leicht erkannt werden kann, ferner daß reine Taurocarbaminsäure, wie in Vorversuchen ermittelt wurde, gut nachweisbar

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 6, 744, 1873.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 93, 1882.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 17, 274, 1893.
[4]) Gazeta Lekarska 1889, Nr. 49 bis 50.
[5]) Compt. rend. Soc. Biol. 114, 228, 1892.
[6]) Journ. of Biolog. Chem. 6, 235, 1909.
[7]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 234, 1882.

und namentlich durch ihren Schmelzpunkt, selbst wo es sich um kleine Mengen handelt, gut charakterisiert ist.

Als sich in den ersten Durchblutungsversuchen keine Bildung von Taurocarbaminsäure ergab, wurde der Leber neben Taurin Glykokoll zugeführt. Es geschah das auf Grund der Vorstellung, daß die isolierte Leber möglicherweise nicht von vornherein genug zur Bildung der $CONH_2$-Gruppe benötigtes Material besitzt.

Um ein Urteil darüber zu gewinnen, ob und wie weit es möglich ist, Taurocarbaminsäure in Organbrei und Blut nachzuweisen, habe ich mit Taurocarbaminsäure eine Anzahl Vorversuche angestellt.

Die Taurocarbaminsäure habe ich aus käuflichem oder aus nach Tauber[1]) aus Galle gewonnenem Taurin nach der Methode von E. Salkowski[2]) dargestellt. Als Gewähr dafür, daß ich es mit einem chemisch-reinen Präparat zu tun hatte, dienten mir die Form der Krystalle und der entsprechende Gehalt von organisch gebundenem Schwefel in demselben.

0,6240 g Taurin: 1,1610 g $BaSO_4$ = 0,1594 S = 25,54 %	Berechnet nach $C_2H_7NO_3S$ 25,60 %
0,4695 g Taurocarbaminsäure: 0,6495 $BaSO_4$ = 0,0892 S = 18,99 %	Berechnet nach $C_3H_8N_2O_4S$ 19,05 %

Ich möchte bemerken, daß die erhaltenen Krystalle der Taurocarbaminsäure gewöhnlich von rosa-bräunlicher Farbe waren und erst nach Reinigen mit Tierkohle farblos wurden. Salkowski[2]) beschreibt sie als quadratische Plättchen. Ich habe in der Mehrzahl der Fälle rhombische Plättchen mit abgeschnittenen spitzen Winkeln, nicht selten schief abgestutzte Prismen erhalten.

Während S. Gabriel[3]), der die Taurocarbaminsäure durch Oxydation von Äthylenpseudothioharnstoff erhalten hat, für dieselbe einen ungefähren Schmelzpunkt von 180° angibt, haben meine wiederholten Bestimmungen einen Schmelzpunkt von 182° (nicht korr.) ergeben. Die Substanz schmilzt, ohne sich zu zersetzen, und gewährt die Möglichkeit, die Bestimmung an ein und derselben Portion mehrere Male zu wiederholen.

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 323, 1904.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 6, 1191, 1873.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 22, 1143, 1889.

Das Natrium- und Bariumsalz stellen stark hygroskopische Verbindungen dar, namentlich das Bariumsalz, das an der Luft rasch zerfließt und nur aus heißem Alkohol auskrystallisiert, in absolutem Alkohol übrigens unlöslich ist. Die Form der Krystalle beider Salze erinnert in hohem Maße an die der freien Säure.

Ein in Wasser unlösliches neutrales Salz darzustellen ist mir mit keinem der gewöhnlich verwendeten Metalle gelungen. Doch geben die Salze der Taurocarbaminsäure ähnlich wie Harnstoff mit salpetersaurem Quecksilberoxyd einen Niederschlag, der die Möglichkeit gewährt, Taurocarbaminsäure aus der Lösung nahezu quantitativ abzuscheiden. Lösungen des taurocarbaminsauren Natrons von 1:10000 geben noch einen bemerkbaren Niederschlag. Diese Eigenschaft verwertete ich in meinen Experimenten.

Um festzustellen, inwiefern die von mir ausgearbeitete Methode ihrem Zwecke entspricht, brachte ich zu einem Liter Ochsenblut 0,5 g Harnstoff, 0,5 g Taurin und 0,5 g Taurocarbaminsäure. Die Eiweißsubstanzen des Blutes wurden mit einer dreifachen Quantität 96%igen Alkohols gefällt und nach 24 Stunden die Flüssigkeit vom entstandenen reichlichen Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde sorgfältig in einer Presse so lange gepreßt, bis er trocken war, die Preßflüssigkeit mit dem Filtrat vereinigt und nach Verdampfung bis zu einem geringen Volumen mit so viel Schwefelsäure und Phophorwolframsäure versetzt, daß die Lösung von beiden etwa 5% enthielt. Nach Absaugen des Niederschlags wurde sie mit Ätzbaryt von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure, dann mit Kohlensäure von Baryt befreit und bei genau neutraler Reaktion zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde sechsmal je eine volle Stunde mit einer Mischung von absolutem Alkohol und Äther extrahiert, dann in Wasser gelöst und nach Ansäuern mit Salpetersäure mit Silbernitrat behufs Entfernung des Chlors gefällt, das Filtrat vom Silberüberschuß mit Schwefelwasserstoff befreit. Nach Neutralisieren mit Ätzbaryt wurde die Flüssigkeit mit geringen Portionen einer gesättigten Lösung von salpetersaurem Quecksilberoxyd unter stetem Neutralisieren mit Barytlösung gefällt. Das Ende der Reaktion wurde an dem Auftreten einer gelben Färbung bei Zusatz einer neuen Portion der Quecksilberlösung erkannt. Der Niederschlag wurde aufs

Filter gebracht, abgesaugt, dann im Wasser verteilt und mittels Schwefelwasserstoff zersetzt.[1]) Das Filtrat von Quecksilbersulfid samt den Waschwässern wurde etwas eingedampft, von Barytresten mit Schwefelsäure befreit, auf ein geringes Volumen gebracht und mehrere Male mit 96%igem Alkohol extrahiert. Nach Abdampfen des größten Teiles des Alkohols wurde der Auszug in einer kleinen Glasschale behufs Krystallisation in den Vakuumexsiccator gebracht.

Die Fällung des Blutes mit Alkohol und dann mit Phosphorwolframsäure diente zur Entfernung sämtlicher Eiweißsubstanzen; die nachfolgende Extraktion mit einer Mischung von absolutem Alkohol und Äther hatte den Zweck, den Harnstoff zu entfernen, da die Salze der Taurocarbaminsäure in dieser Mischung unlöslich sind.

Die Entfernung des Chlors war unerläßlich, da Chloride die Fällung der Taurocarbaminsäure durch Quecksilbernitrat in ähnlicher Weise hemmen, wie man dies bei der Liebigschen Reaktion mit Harnstoff beobachtet. Die Nichtfällbarkeit der Salze der Taurocarbaminsäure durch 72%igen Alkohol und durch Phosphorwolframsäure selbst in höheren Konzentrationen im Vergleich mit den Bedingungen des Versuchs habe ich zuvor an einzelnen Portionen festgestellt.

Im vorliegenden Vorversuch wurden von 0,5 g zugesetzter Taurocarbaminsäure 0,46 g vom Schmelzpunkt 182° wiedergewonnen; die Krystallform war mit der oben beschriebenen identisch.

Die Anordnung der Durchblutungsversuche war die im hiesigen Institut seit langem übliche,[2]) nur konnte ich den vervollkommneten Durchblutungsapparat des Instituts benutzen.[3]) Ich verwendete ausschließlich Lebern vom Hunde und defibriniertes Rinderblut, das, wie Embden[4]) gezeigt hat, in vielen Fällen Hundeblut zu ersetzen imstande ist.

[1]) Das Verfahren ist demjenigen, das W. v. Schroeder (Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak. 15, 364, 1882) für den Harnstoffnachweis bei Leberdurchblutung angegeben hat, analog.

[2]) Vgl. Embden und Gläßner, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 313, 1905.

[3]) Vgl. F. Mandel, Ein neuer Apparat zur Durchblutung überlebender Organe. Zeitschr. f. biol. Techn. u. Method. 1, 44, 1905.

[4]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 44, 1905.

Versuch 1.

Durch die im entbluteten Zustande 237 g wiegende Leber wurden während 2 Stunden 2 l defibriniertes Ochsenblut unter Zusatz von 10 g Taurin, das in 200 ccm destillierten Wassers gelöst war, durchgeleitet. Der Zusatz der Taurinlösung geschah allmählich, damit keine rasche Änderung des osmotischen Druckes eintrete. Die Durchströmung der Leber vollzog sich mit einer Schnelligkeit von 180 bis 190 ccm in der Minute; das ganze Blut ging somit während des Experiments 10mal durch die Leber. Der Druck betrug während der ersten Stunde 10 bis 15 mm Quecksilber, in der zweiten Stunde 20 bis 25 mm.

Versuch 2.

Durch die im entbluteten Zustande 572 g wiegende Leber wurden während 2 Stunden 2 l defibriniertes Ochsenblut durchgeleitet, zu dem 10 g Taurin, in 200 g destillierten Wassers gelöst, zugesetzt waren. Die Schnelligkeit der Durchblutung betrug ca. 300 ccm in der Minute, so daß das gesamte Blut während des Experiments die Leber ca. 16mal passierte. Der Druck betrug während der ganzen Dauer des Experiments 10 bis 15 mm Quecksilber.

Nach Beendigung des Versuchs wurde das Blut mit der dreifachen Quantität 96%igen Alkohols versetzt, darauf in die Mischung auch die in einer Fleischhackmaschine zerkleinerte Leber gebracht. Wenn auch das Verfahren zum Nachweis der Taurocarbaminsäure sonst in den Hauptzügen dem oben beschriebenen entsprach, mußte man wegen reichlichen Gehaltes an Zucker, Oxysäuren, harzartigen Substanzen, die in das Blut aus der Leber übergehen, und die teils durch salpetersaures Quecksilberoxyd gefällt werden, teils in die Alkohollösung übertreten, die Analyse etwas komplizieren. Zum Zwecke der Entfernung des Zuckers wurde die Flüssigkeit nach Verdampfung des Alkohols mit Hefe 24 Stunden lang der Gärung überlassen; zum Zwecke der Entfernung der harzigen Substanzen wurde sie unmittelbar nach der Fällung mit Phosphorwolframsäure und nach deren Beseitigung der wiederholten Reinigung mittels Fällung durch Bleiacetat, Abfiltrieren des entstandenen Niederschlages und Entfernung des Bleiüberschusses mit Schwefelwasserstoff unterzogen.

In beiden Versuchen erhielt ich nur eine außerordentlich geringfügige Quantität von kleinen, flachen, spindelförmigen Krystallen organischer Natur mit dem Schmelzpunkt 137°. Organisch gebundenen Schwefel enthielten die Krystalle nicht. Wegen der geringfügigen Quantität konnten sie einer weiteren Untersuchung nicht unterzogen werden.

Versuch 3.

Durch die im entbluteten Zustande 413 g wiegende Leber wurden 2 Stunden lang 2 l defibriniertes Ochsenblut unter Zusatz von 5 g Taurin und 5 g Glykokoll, gelöst in 200 g Wasser, durchgeleitet.

Das Blut floß mit einer Schnelligkeit von 200 ccm in der Minute, d. h. das Blut passierte die Leber ca. 11 mal. Der Druck betrug zu Beginn des Experiments 17 bis 22 mm, zu Ende desselben 27 bis 32 mm Quecksilber.

Versuch 4.

Durch die im entbluteten Zustande 442 g wiegende Leber wurden 2 Stunden lang 2 l defibriniertes Ochsenblut unter Zusatz von 5 g Taurin und 5 g Glykokoll, in 200 ccm destillierten Wassers aufgelöst, durchgeleitet. Die Schnelligkeit betrug im Durchschnitt 240 bis 250 ccm in der Minute; während des Experiments passierte das Blut die Leber ca. 13 mal. Der Druck betrug während der ganzen Zeit 15 bis 20 mm Quecksilber.

In den Versuchen 3 und 4 erhielt ich nach Ansäuern mit Schwefelsäure und wiederholtem Extrahieren mit Alkohol einige Gramm einer zäh-sirupösen, leicht gelblichen Masse, die eine große Quantität organisch gebundenen Schwefels enthielt und bei der Prüfung nach Lüdy[1]) keine Spur von Harnstoff erkennen ließ. Leider zeigten beide Proben eine so geringe Krystallisationsneigung, daß sich die ursprüngliche Absicht, die Anwesenheit der Taurocarbaminsäure durch Darstellung und Schmelzpunktbestimmung nachzuweisen, als undurchführbar erwies. Doch gelang es, die erfolgte Bildung von Uraminosäuren auf einem Umweg nachzuweisen.[2])

Bekanntlich spalten sich Uraminosäuren beim Erhitzen mit Barytwasser unter Bildung von Kohlensäure, Ammoniak und der zugehörigen Aminosäure.

Etwa 1 g des in Versuch 4 erhaltenen Sirups wurde in 10 ccm Wasser gelöst, die Flüssigkeit mit Barytwasser neutralisiert, mit 10 ccm $^n/_{10}$-Lauge versetzt und das völlig klare Filtrat $4^1/_2$ Stunden im Einschlußrohr auf 210 bis 220° erhitzt [Salkowski[3])]. Nach dieser Zeit hatte sich in der etwas gebräunten Flüssigkeit viel Ammoniak und ein reichlicher Niederschlag von Bariumcarbonat gebildet. Es lag somit eine Uraminosäure vor. Die vom Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit enthielt reichlich organisch gebundenen Schwefel, doch gelang

---

[1]) Monatsh. f. Chem. 10, 295, 1889.

[2]) Ich verdanke die nachstehenden Daten Herrn Professor Hofmeister, der die Güte hatte, nach meiner Abreise von Straßburg die Untersuchung der sirupösen Produkte vorzunehmen.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 62, 1880.

es in diesem Falle wegen des vorhandenen Salzes nicht, die abgespaltene Aminosäure zu isolieren.

Als zweckmäßiger erwies sich die Spaltung mit Säure.

Etwa $1^1/_2$ g des Sirups von Versuch 4 wurden mit 10 ccm Wasser und 10 ccm konz. Salzsäure im Einschlußrohr 6 Stunden auf 160° erhitzt. Beim Eröffnen des Rohres war deutlicher Überdruck vorhanden. Die Flüssigkeit enthielt sehr viel Ammoniak und lieferte beim Einengen eine reichliche Krystallisation von Salmiak. Um Chlor und Ammoniak zu entfernen, wurde die Lösung mit Bleioxyd wiederholt eingedampft, bis sie kein Ammoniak mehr abgab. Nach längerem Stehen wurde dann von Bleioxyd und Bleichlorid abfiltriert, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs zur Krystallisation eingeengt. Über Nacht schieden sich etwas bräunlich gefärbte, zarte mikroskopische Rosetten und daneben farblose makroskopische Nadeln und Prismen ab. Durch geeignete Behandlung mit 60%igem Alkohol und Umkrystallisieren konnte der farblos krystallisierende Körper in glashellen, zentimeterlangen flachen Prismen und in sechsseitigen Tafeln genau von dem Aussehen des Taurins erhalten werden. Die Krystalle waren aschefrei, enthielten reichlich Schwefel und zersetzten sich beim Erhitzen erst gegen 290°. Es lag somit unzweifelhaft Taurin vor.

Da die Darstellungsmethode die Beimengung von Taurin zu dem erhaltenen Produkt sicher ausschließt, wie auch aus dem negativen Ergebnis der Versuche 1 und 2 hervorgeht, ist der Schluß berechtigt, daß die gebildete Uraminosäure (zu einem Teil) Taurocarbaminsäure war. Daß diese nicht direkt auskrystallisierte, ist auf die Anwesenheit von anderen, die Krystallisation erschwerenden organischen Substanzen zu beziehen. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs und des durch Salzsäure bei 160° als Ammoniak abspaltbaren Stickstoffs ergab, daß das Produkt etwa zur Hälfte aus Uraminosäuren bestand, doch gelang es nicht sicherzustellen, ob sich neben Taurocarbaminsäure etwa Hydantoinsäure gebildet hatte.

Die Tatsache, daß Taurinzufuhr allein keine Bildung von Taurocarbaminsäure eingeleitet hatte, während sie bei gleichzeitiger Glykokollzufuhr erfolgt war, spricht gegen die Auffassung, daß die an das Taurin sich anlagernde $CONH_2$-Gruppe in der

Leber vorgebildet zu sein pflegt. Vielmehr liegt der Eindruck nahe, daß diese Gruppe erst auf Kosten des Glycins entstanden sei. Das kann wohl am einfachsten im Sinne der „oxydativen Synthese" gedeutet werden, ist aber auch mit anderen Vorstellungen vereinbar. Da nunmehr die Uraminosäurebildung in der Leber sich als brauchbares Hilfsmittel zur Erforschung der Harnstoffsynthese erwiesen hat, dürfte es möglich sein, bald weiteres experimentelles Material zur Klärung dieser Frage beizutragen. Insbesondere wird aber auch zu untersuchen sein, ob die Bildung der Uraminosäuren nicht eine regelmäßige Vorstufe des Harnstoffs bei seiner Entstehung aus Aminosäuren darstellt. Es ergibt sich weiter die Notwendigkeit, eine Angabe von Salaskin[1]) nachzuprüfen, der zufolge die Durchströmung der Leber mit aminosäurehaltigem Blut Harnstoffbildung zur Folge hat. Die von Salaskin benutzten zwei Methoden der Harnstoffbestimmung nach Schöndorff und nach Meißel und Nencki, die beide auf dem Zerfalle des Harnstoffs durch Säure unter Bildung von Ammoniak beruhen, sind in diesem Falle nicht eindeutig. Sie mußten auch dann ein positives Resultat geben, wenn sich in Salaskins Versuchen nicht Harnstoff, sondern Uraminosäuren gebildet hatten.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 123, 1898.

Über die Zusammensetzung und einige Eigenschaften der weißen Blutkörperchen.

Von

Stefano Mancini, Livorno.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 16. April 1910.)

I.

Läßt man ungerinnbar gemachtes Blut langsam absitzen, so scheiden sich, wie bekannt, die weißen Blutkörperchen als zarte weiße Schicht oberhalb des aus Erythrocyten bestehenden Bodensatzes ab. Es liegt nahe, durch Untersuchung dieser Schicht näheres über Zusammensetzung und Eigenschaften der Blutleukocyten festzustellen. Immerhin ist dieses Ausgangsmaterial spärlich, und, wie es zunächst erhalten wird, so wenig einheitlich, daß es verständlich erscheint, wenn dieser Versuch bisher nicht in größerem Umfange angestellt worden ist.

Demgemäß beschränken sich die Angaben über den Aufbau und die chemischen Eigenschaften der Blutleukocyten zumeist nur auf den Hinweis, daß sie den genauer untersuchten Leukocyten anderer Herkunft, jenen des Eiters, der Thymus, der Lymphdrüsen, nahe stehen, und vielfach sind die hier gesammelten Erfahrungen einfach auf die Blutleukocyten übertragen worden.

Dieser Sachverhalt entspricht wenig der Wichtigkeit der physiologischen Funktionen, die man den Blutleukocyten zuzuschreiben geneigt ist. Ich bin daher gern dem Vorschlag von Prof. Hofmeister gefolgt, ein Verfahren zur Gewinnung größerer Mengen von Blutleukocyten, das im hiesigen Laboratorium bereits wiederholt versuchsweise benutzt worden war, weiter auszuarbeiten und so genügendes Material zu einer eingehenden

Untersuchung zu gewinnen. Dabei war allerdings nicht aus dem Auge zu verlieren:

1. daß die Blutleukocyten morphologisch und physiologisch ungleichwertige Elemente sind;

2. daß sie je nach den gegebenen Ernährungsverhältnissen schon wegen ihrer Fähigkeit, Fett, Glykogen und wohl auch andere Stoffe aufzuspeichern, eine recht verschiedene Zusammensetzung aufweisen müssen;

3. daß die Darstellungsmethode, wie immer man sie verfeinert, eine absolute Abtrennung von an der Oberfläche von Leukocyten haftenden fremden Elementen, z. B. Blutplättchen, Fetttröpfchen, Calciumoxalatkryställchen, nicht gewährleistet; endlich

4. daß der Zusatz eines Antisepticums bei der Dauer des Isolierungsverfahrens nicht zu entbehren und damit die wenn auch wenig ins Gewicht fallende Möglichkeit einer chemischen Veränderung des ursprünglichen Materials gegeben ist.

Diese Überlegungen konnten nicht abhalten, die direkte chemische Untersuchung der Blutleukocyten in Angriff zu nehmen. Wohl aber kommen sie für die Frage in Betracht, in welchem Umfang die gewonnenen Resultate zu Rückschlüssen auf die Leukocyten des intakten Blutes berechtigen.

II. Darstellungsmethode.

Man läßt größere Mengen Oxalatblut vom Pferde — nicht unter 30 l — 20 Stunden in hohen, 7 bis 8 l fassenden Glaszylindern bei niederer Temperatur absitzen, entfernt dann vorsichtig und möglichst vollständig das überstehende Plasma, das den größten Teil der Blutplättchen mit wenig Leukocyten enthält. Danach ist es meist nicht schwierig, die oberste, vorzugsweise aus Leukocyten bestehende weiße Schicht des Bodensatzes in den stark geneigten Zylindern fast ohne Beimengung von Erythrocyten abzuschöpfen. Der so erhaltene, wenig blutig gefärbte Leukocytenbrei läßt sich nun leicht durch Suspendieren in viel physiologischer (0,9%iger) Kochsalzlösung und rasches, dabei stets nur kurzdauerndes Zentrifugieren von den beigemengten roten Blutkörperchen befreien, da unter diesen Verhältnissen die Leukocyten sich zu Klumpen zusammenballen und bald am Boden absetzen. In den meisten Fällen ließ sich

durch 15 bis 20maliges Aufrühren mit Kochsalzlösung, Zentrifugieren und Abgießen der überstehenden Flüssigkeit ein schneeweißes Präparat erhalten. Nur manchmal behielt es einen Stich ins Gelbliche. Gelang es nicht, die roten Blutkörperchen völlig zu entfernen, so wurde das Präparat verworfen.

Bei den zahlreichen in dieser Richtung ausgeführten Versuchen erwies sich einerseits zur Fernhaltung von Fäulnis ein Zusatz von Toluol zu der Waschflüssigkeit (1 : 1000), sodann aber auch die Zufügung von etwas Oxalat (1 Teil Ammoniumoxalat auf 10000 Teile) als zweckmäßig. Letztere Maßnahme war veranlaßt durch die wiederholt gemachte Beobachtung, daß der Leukocytenbrei beim Waschen mit gewöhnlicher physiologischer Kochsalzlösung zu einem derben Gerinnsel zusammenfloß, das durchaus das Aussehen und mechanische Verhalten gewaschenen Fibrins darbot und eine weitere Reinigung durch Zentrifugieren nicht mehr gestattete. Diese Erscheinung wurde nicht mehr beobachtet, als wir den Oxalatzusatz zur Waschflüssigkeit regelmäßig anwandten.

Der erhaltene Leukocytenbrei war frei von roten Blutkörperchen, ließ aber unter dem Mikroskop die Anwesenheit von Blutplättchen, wenn auch nur in spärlicher Zahl erkennen. Krystalle von Calciumoxalat, an deren Gegenwart nach dem Gange der Darstellung gedacht werden konnte, wurden mikroskopisch nicht gefunden, obgleich die spätere chemische Untersuchung eine erhebliche Beimengung dieses Salzes ergab.

Um eine für die chemische Untersuchung hinreichende Menge von Leukocyten zu erhalten, bedurfte es etwa 150 l Pferdeblut. Die Verarbeitung von ca. 30 l dauerte nicht über 24 Stunden. Die winterliche Temperatur und der geringfügige Zusatz von Toluol zum Waschwasser ermöglichte es, die Darstellung unter Vermeidung jedes Zeichens von Fäulnis auszuführen. Die Ausbeute betrug etwa 30 ccm feuchte Leukocyten pro 30 l Pferdeblut.

III. Einiges über die Zusammensetzung der Blutleukocyten.

Da trotz Verarbeitung großer Blutmengen die Ausbeute immerhin eine spärliche war, konnte nur eine beschränkte Zahl von Analysen durchgeführt werden, und zwar an Präparaten verschiedener Darstellung. Die erhaltenen Zahlen sind dem-

entsprechend nicht Durchschnittswerte. Sie geben aber immerhin einen Einblick in die einschlägigen Verhältnisse.

Zunächst suchten wir uns über die Natur der in den Leukocyten enthaltenen Substanzen zu orientieren. Dabei war anzunehmen, daß das anhaltende Waschen mit viel Kochsalzlösung die wasserlöslichen Bestandteile entfernt haben dürfte. Indes ergab sich, daß beim Verreiben mit physiologischer Kochsalzlösung aus den zertrümmerten Zellen noch geringe, aber doch merkliche Mengen Eiweiß in Lösung gingen. Der betreffende Eiweißkörper war durch Salpetersäure und durch gesättigte Ammonsulfatlösung fällbar.

Die Hauptmasse der Leukocyten löste sich beim Stehen in einer Natriumcarbonatlösung von 0,1%. Die trübe Lösung wurde durch Essigsäure gallertig-flockig gefällt. Der sehr reichliche Niederschlag enthielt Phosphor und spaltete bei Hydrolyse mit Säure Substanzen ab, die durch Silbernitrat in ammoniakalischer Lösung gallertig fällbar waren. Diese nucleoproteidähnliche Substanz bildet die Hauptmasse der Leukocytenproteide.

Zur Orientierung über die Zusammensetzung des Leukocytenleibes wurde das im Vakuum getrocknete Präparat von zwei Darstellungen mit Alkohol, Äther und Chloroform erschöpft und zur Analyse gebracht.

Dabei ergab sich, daß die erhaltenen Leukocyten noch sehr erhebliche Mengen von anhaftendem Calciumoxalat enthielten. Leider konnte nur in einem Präparat die Größe dieser Beimengung durch direkte Bestimmung (Extraktion mit verdünnter Salzsäure und Fällung mit Ammoniumacetat) ermittelt werden.

Präparat A, mit Alkohol, Äther und Chloroform erschöpft, vakuumtrocken, enthielt 36,44% C, 5,19% H, 9,75% N, 0,678% P. Die Bestimmung des Calciumoxalats ergab einen Gehalt daran von 32,21%. Wird dieser Betrag von der Gesamtsubstanz und die darin enthaltene Kohlenstoffmenge von dem obigen C-Werte in Abzug gebracht, so ergibt sich für die trockene und entfettete Substanz der weißen Blutkörperchen:

(A) C = 44,82%, H = 7,66%, N = 14,38%, P = 1,00%,
S + O + Asche = 32,14%.

In einem zweiten Präparat wurde die Zusammensetzung der vakuumtrockenen Leukocyten vor und nach der Extraktion mit Alkohol, Äther und Chloroform ermittelt.

Es wurden gefunden (in dem noch oxalathaltigen Präparat):

(B) vor der Extraktion C = 41,37%, H = 6,38%, N = 8,51%, S = 1,75%, P = 0,945%, Asche = 21,37%.

(C) nach der Extraktion C = 36,17%, H = 5,48%, N = 9,67%, S = 0,699%, P = 0,67%, Asche = 24,31%.

Die Alkohol-, Äther- und Chloroformextraktion hatte in diesem Falle einen Gehalt von 12,1% an Fett und Lipoiden ergeben. In einem anderen Falle betrug er 18,82%.

Der Vergleich von Analyse B und C lehrt, daß die Extraktion eine fast identische Erhöhung des Stickstoff- und Aschegehaltes zur Folge gehabt hat (13,6% für N, 14,0% für die Asche), so daß anzunehmen ist, daß in das Extrakt nur sehr wenig Stickstoff übergegangen war. Hingegen zeigt die Abnahme an Phosphor und namentlich an Schwefel, daß die Leukocyten sowohl Lipoide vom Charakter der Phosphatide als der Sulfatide enthalten. Daß der Gehalt der Leukocyten an ätherlöslicher Substanz sehr schwankt, war bei deren bekannter Fähigkeit, sich mit Fett zu beladen, von vornherein zu erwarten.

Der bei der Extraktion zurückbleibende Phosphor ist als dem Nucleoproteid des Leukocytenprotoplasmas angehörig zu betrachten. Der zurückbleibende Schwefel kann ebensowohl Bestandteil der Nucleinstoffe wie anderer Eiweißkörper sein.

Ein Vergleich der gefundenen Zahlen mit dem von Hoppe-Seyler für Eiterzellen, von Lilienfeld und Bang für Thymuszellen und von Bang für Lymphdrüsenzellen ermittelten Werten ist bei dem Fehlen der Bestimmung einzelner Bestandteile nicht durchzuführen. Immerhin bestehen mannigfache Analogien. Namentlich scheint das Überwiegen eines Nucleoproteids unter den eiweißähnlichen Bestandteilen den Zellen dieser Gruppe gemeinsam.

Um dieses Nucleoproteid näher kennen zu lernen, habe ich in zwei Fällen Leukocytenbrei mit 0,1%iger Sodalösung ausgezogen und den in Lösung gegangenen Anteil nach Fällen mit Essigsäure, Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther zur Analyse gebracht.

Präp. I. Bei 100° getrocknet.
C = 44,43, 44,47%,
H = 6,38, 6,61%,
S = 1,15%,
P = 0,42%,
Asche = 7,94%.

Präp. II. Mehrmals mit Sodalösung umgefällt. Bei 100° getrocknet.
C = 49,46%,
H = 7,31%,
N = 15,84%,
S = 1,30%,
P = 0,13%,
Asche = 3,65%.

Die Verschiedenheit in der Zusammensetzung der beiden Präparate ist zu groß, um irgendwelche Schlüsse zu gestatten, zumal die Abnahme des Phosphorgehaltes beim Umfällen entweder auf eine gewisse Zersetzlichkeit des Nucleoproteids oder auf die überwiegende Anwesenheit eines phosphorfreien Albuminats hinweist.

Wenn Bang bemerkt, daß sich aus Leukocyten des Rinderblutes nicht weniger als 86% der festen Stoffe als eine Art Albuminat erhalten lassen, so kann ich dem beistimmen. Die Natur dieser albuminatähnlichen Eiweißstoffe wird freilich noch näher zu untersuchen sein.

IV. Die Fermente der weißen Blutkörperchen.

Es ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt, daß leukocytenreiche pathologische Flüssigkeiten — Eiter, entzündliche Exsudate — ausgesprochene Fermentwirkungen aufweisen, die anscheinend von den geformten Elementen ausgehen. Daß auch die farblosen Blutkörperchen solche Wirkungen namentlich proteolytischer Natur ausüben, ist durch Erfahrungen an normalem und leukämischen Blute sehr wahrscheinlich geworden und genauer von E. Müller und Jochmann[1]) untersucht worden.

Diesen Autoren zufolge entfalten Leukocyten vom Menschen, von Affen und (in geringerem Grade) vom Hunde proteolytische Wirkungen gegenüber erstarrtem Blutserum, wenn sie vorübergehend durch Erhitzen über 50° geschädigt werden.

[1]) Ed. Müller und Jochmann, Münch. med. Wochenschr. 1906, 1393, 1507, 2002.

Sie enthalten somit die Vorstufe eines proteolytischen Ferments, das durch Erhitzen auf 50° aktiviert wird. Das Ferment selbst zeigt in seiner Wirkungsweise die größte Ähnlichkeit mit Trypsin.[1]) Die Leukocyten des Pferdes fanden Müller und Jochmann unwirksam.

Aus meinen Versuchen mit den vollkommen von Blutplasma und Erythrocyten befreiten Leukocyten ergab sich folgendes:

Proteolytische Wirkung in schwach salzsaurer Lösung (0,2 % HCl) (Pepsinwirkung) wurde bei Prüfung mit Fibrin stets vermißt.

Proteolytische Wirkung in toluolhaltiger neutraler Lösung gegenüber frischem Fibrin trat nicht oder sehr spät ein (z. B. erst nach 6 Tagen). Hingegen war sie sehr ausgesprochen, wenn der Leukocytenbrei für ganz kurze Zeit mit $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure zusammengebracht, dann durch die äquivalente Menge Lauge genau zurückneutralisiert wurde. Zugesetztes Fibrin ging dann rasch, spätestens in 40 Stunden in Lösung. Das betreffende trypsinähnliche Ferment ist somit in den Blutleukocyten nicht als solches, sondern in Form seines Zymogens vorhanden, das man vorläufig als „Leukocytenprotrypsin" bezeichnen kann.

Eine gelatineverflüssigende Wirkung war nicht vorhanden. Erepsinwirkung war weder vor noch nach der Aktivierung mit Säure nachweisbar.

Hingegen fehlte es nicht an diastatischen Fermenten. Glykogenlösung, mit Leukocyten versetzt, zeigte nach 6 Stunden, Stärkelösung nach 12 Stunden Reduktion.

Deutliche fettspaltende Wirkung gegenüber Mandelölemulsion war nicht vorhanden. Aktivierung mit Säure war darauf ohne Einfluß.

Wohl aber zeigten die Leukocyten geringe, aber unzweifelhafte Labwirkung.

Beim Zusammenbringen mit flüssig erhaltenem Gansplasma erzeugten die frischen Leukocyten in 2 bis höchstens 15 Minuten schönste Gerinnung.

---

[1]) Jochmann und Lockemann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 449, 1908.

Von Oxydasewirkungen war die Reaktion mit p-Phenylendiamin und α-Naphthol (Laccasewirkung) sowohl bei den frischen wie bei den über Schwefelsäure getrockneten Leukocyten sehr ausgesprochen. Andere Oxydasen (Peroxydase, Tyrosinase) konnten nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Die wiederholte Prüfung auf glykolytische Wirkung, durch 24stündiges Digerieren von Glucoselösung mit Leukocytenbrei unter Toluol, ergab keinen Anhaltspunkt für die Annahme eines glykolytischen Ferments.

Von diesen Beobachtungen steht der Nachweis eines proteolytischen Ferments in den weißen Blutkörperchen des Pferdes anscheinend mit dem oben erwähnten Befunde von Ed. Müller und Jochmann in Widerspruch. Vermutlich handelt es sich jedoch nur um eine Verschiedenheit der Pferdeleukocyten in bezug auf die Aktivierbarkeit des Protrypsins, da Müller und Jochmann zur Aktivierung bloß erhöhte Temperatur benutzt haben. Da die Leukocyten bei pathologischen Vorgängen oft ausgesprochene proteolytische Wirkungen entfalten, wäre es erwünscht, die Bedingungen dieser Aktivierung genauer zu kennen. Denn auch das „Absterben" und „Zerfallen" der Leukocyten kann nur durch Vermittlung eines aktivierenden Agens zum Freiwerden des proteolytischen Ferments führen.

Der Umstand, daß die Leukocyten zunächst nur Protrypsin enthalten, dessen Aktivierungsbedingungen noch nicht zu übersehen sind, macht die mannigfachen Verschiedenheiten verständlich, die in betreff der proteolytischen Wirkung von Eiter und Exsudaten gelegentlich bemerkt worden sind.

Als Bekräftigung einer wohl allgemein angenommenen, aber bisher nicht direkt demonstrablen Vorstellung dürfte der Nachweis willkommen sein, daß die isolierten Leukocyten des Blutes direkt den Gerinnungsvorgang auszulösen vermögen.

V. Verhalten der Blutleukocyten gegenüber Saponin und Tetanotoxin.

5%ige Suspension von roten Pferdeblutkörperchen wurde mit Sapotoxinlösung zusammengebracht, nachdem diese mit Leukocytenemulsion $^1/_2$ Stunde geschüttelt worden war. Das Ergebnis dieser und der Kontrollversuche war:

	Saponinlösung 0,01 % ccm	5 % Erythrocytenemuls. ccm	Leukocytenemulsion ccm	Hämolyse
1	5	2	—	komplett
2	5	2	—	„
3	5	2	3	fehlt
4	5	2	2	„
5	5	2	1	„

Ebenso wie in diesem Falle erwiesen sich die Leukocyten gegenüber dem Tetanusgift stark antihämolytisch.

Hingegen konnte eine antitetanische Wirkung nicht nachgewiesen werden.

Wurde eine Menge Tetanusgift, die die einfache und doppelte für Mäuse tödliche Dosis enthielt, mit Leukocytenbrei gemischt, 1 Stunde lang geschüttelt, dann 48 Stunden im Brutofen belassen und schließlich zentrifugiert, so ergab die Flüssigkeit bei Mäusen die gleiche Giftigkeit wie eine entsprechend verdünnte Kontrollösung.

Über den Restkohlenstoff des Blutes.

Von

Stefano Mancini, Livorno.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 16. April 1910.)

Während die Bestimmung des „Reststickstoffs" im Blute Gegenstand zahlreicher Arbeiten geworden ist, liegen Untersuchungen über den Restkohlenstoff des Blutes, d. h. über die Menge von Kohlenstoff, die nach Entfernung aller eiweißartigen Bestandteile und der Kohlensäure zurückbleibt, nicht vor, und doch dürfte die Orientierung über diesen Punkt kaum eine geringere Wichtigkeit beanspruchen. Für das Verständnis des Stoffaustausches ist die Untersuchung der durch das Blut von Organ zu Organ transportierten Stoffe, so gering ihre Menge in der Zeiteinheit sein mag, eine notwendige Voraussetzung. Denn unter ihnen finden sich neben den endgültig zur Ausscheidung bestimmten Stoffen auch jene intermediären Produkte des Stoffwechsels, die, wie der Zucker, das Adrenalin, die Hormone, die Immunkörper u. a., vor ihrem Abbau höchst wichtige physiologische Aufgaben zu erfüllen haben.

Im Plane der vorliegenden, von Prof. Hofmeister angeregten Untersuchung lag es zunächst zu ermitteln, ob das Blut neben den Eiweißstoffen, dem Zucker, Harnstoff und den Carbonaten kohlenstoffhaltige Substanzen in einer Menge enthält, die einer quantitativen Bestimmung zugänglich ist. Im Falle das möglich war, sollte die Brauchbarkeit des Verfahrens für die Untersuchung des normalen und pathologisch veränderten Blutes näher geprüft werden.

1. Zur Methodik.

Nach den vorliegenden Erfahrungen enthalten Blutplasma und Blutserum neben den koagulablen Eiweißkörpern noch konstant ein Glykoproteid von Albumosencharakter (Serummucoid), Zucker, Fett und Harnstoff in nennenswerter Menge. Außerdem aber finden sich darin regelmäßig Seifen, Lecithin, Cholesterinester, gelegentlich auch Milchsäure, Kreatin, Harnsäure, verschiedene Aminosäuren, Farbstoffe und andere organische Substanzen, allerdings unter normalen Verhältnissen in sehr geringer Menge.

Um den Kohlenstoff der nicht eiweißartigen Stoffe zu bestimmen, bedurfte es eines Verfahrens, durch das es möglich war, die proteinartigen Stoffe und nur diese, restlos zu entfernen. Ein diesem Anspruch voll genügendes Verfahren zu finden, gelang nicht. So führten Versuche mit Auskoagulieren, Aussalzen mit Zinksulfat oder Natriumsulfat und ähnliches nicht zum Ziel. Hingegen erwies sich die Fällung mit Phosphorwolframsäure als ein für die Entfernung der Proteinstoffe bequemes und genaues Verfahren. Sie gestattet mit aller wünschenswerten Schärfe die Entfernung aller Proteine einschließlich des Serummucoids. Sie entspricht nur insofern nicht ganz dem ins Auge gefaßten Zweck, als sie auch einige nicht proteinartige Stoffe, so von den oben genannten die Harnsäure, ausfällt, überdies, weil sie in saurer Lösung angewendet werden muß, auch einen Verlust an wasserunlöslichen Säuren, z. B. an hohen Fettsäuren, bedingen kann. Ferner ist zu bedenken, daß der erzeugte Niederschlag neben Eiweiß alle in Wasser unlöslichen, wahrscheinlich auch die in kolloidaler Suspension befindlichen Bestandteile mit niederreißt.

Trotz dieser Schattenseiten bin ich bei der Verwendung der Phosphorwolframsäuremethode stehen geblieben, zumal da ich mich bald überzeugte, daß sie unter sich gut vergleichbare Werte ergibt.

Zur Bestimmung des Kohlenstoffes in der untersuchten Flüssigkeit diente das Verfahren von Messinger, in der Form, wie sie von Spiro im hiesigen Laboratorium für die Bestimmung des Harnkohlenstoffs benutzt wird.

Das Verfahren gestaltet sich, wie folgt. Ein abgemessenes Volum defibrinierten oder mit Natriumfluorid ungerinnbar gemachten Blutes

wird mit 4 Volumen destillierten Wassers verdünnt, mit 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure auf je 100 ccm Flüssigkeit versetzt und mit 10% iger reiner Phosphorwolframsäurelösung völlig ausgefällt. Vom Filtrat wird ein aliquoter Teil in dem 500 ccm fassenden Oxydationskolben mit 1 Tropfen Quecksilber, 15 g Kaliumbichromat und 100 ccm konzentrierter Schwefelsäure zusammengebracht. Der Zersetzungskolben ist durch eingeschliffene Verbindungen auf einer Seite zum Durchleiten kohlensäurefreier Luft eingerichtet, auf der anderen mit 5 U-Röhren, die zum Trocknen und Absorbieren der Kohlensäure dienen,[1]) verbunden. Nach Prüfung der Verschlüsse wird zunächst die Reaktionsflüssigkeit andauernd erhitzt, zum Schluß, wenn die Oxydation zu Ende ist, nach Entfernen der Flamme die Kohlensäure durch einen Luftstrom in die Absorptionsröhren getrieben.

Die Oxydation erfolgt anscheinend wegen der Anwesenheit von Phosphorwolframsäure, recht langsam. Man kann sie nicht vor 7 Stunden als sicher beendet ansehen. Zum Luftdurchleiten am Schlusse genügt $^1/_2$ Stunde.

Die Übereinstimmung der stets ausgeführten Doppelbestimmungen war sehr befriedigend. Die Befürchtung, daß die im Blute enthaltene präformierte Kohlensäure die Resultate beeinflußt, erwies sich als unbegründet. In Parallelversuchen, wo einerseits das Phosphorwolframsäurefiltrat direkt, andrerseits nach 2stündigem Durchleiten kohlensäurefreier Luft bei 40° analysiert wurde, erhielt ich identische Werte.

Bei der langen Dauer der Einzelversuche ist es sehr zweckmäßig, mehrere Analysen nebeneinander auszuführen. Ich hatte regelmäßig 4 Apparate nebeneinander in Betrieb.

2. Versuche mit Normalblut.

Ich habe Bestimmungen mit dem Blute von Hund, Rind, Pferd und Kaninchen ausgeführt.

A. Bestimmungen am defibrinierten Blut.

In den nachstehend tabellarisch zusammengestellten Versuchen wurden die Kohlenstoffbestimmungen an ganz frischem Blut einmal direkt (A), sodann nach Austreiben der etwa vorhandenen präformierten Kohlensäure (B) vorgenommen.

---

[1]) Das erste U-Rohr ist mit Glasperlen, das zweite mit Chlorcalcium gefüllt, das dritte und vierte enthalten Natronkalk und dienen zur Absorption und Wägung der Kohlensäure, ein fünftes, mit Chlorcalcium und Natronkalk gefüllt, schützt die Absorptionsröhren vor Wasser- und Kohlensäurezutritt aus der Luft.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Blut von	ccm	CO_2 g	CO_2 g in 100 ccm Blut	CO_2 Mittel	C Mittel
1 A	Hund	2,5	0,0694	0,2776	0,2820	0,0769
		„	0,0716	0,2864		
1 B	„	„	0,0726	0,2904	0,2900	0,0791
		„	0,0724	0,2896		
2 A	Rind	„	0,0714	0,2856	0,2896	0,0790
		„	0,0734	0,2936		
2 B	„	„	0,0704	0,2816	0,2956	0,0806
		„	0,0774	0,3096		
3 A	Pferd	„	0,0682	0,2728	0,2692	0,0734
		„	0,0664	0,2656		
3 B	„	„	0,0690	0,2760	0,2852	0,0778
		„	0,0736	0,2944		

B. Bestimmungen an Fluoridblut.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Blut von	ccm	CO_2 g	CO_2 g in 100 ccm Blut	CO_2 Mittel	C Mittel
4	Hund	25	0,0694	0,2776	0,2800	0,0764
		„	0,0706	0,2824		
5	„	„	0,0700	0,2800	0,2860	0,0780
		„	0,0730	0,2920		
6	„	„	0,0681	0,2724	0,2670	0,0728
		„	0,0654	0,2616		
7	„	20	0,0588	0,2940	0,2970	0,0810
		„	0,0600	0,3000		
8	„	25	0,0760	0,3040	0,2900	0,0791
		„	0,0690	0,2760		
9	„	„	0,0698	0,2792	0,2760	0,0753
		„	0,0682	0,2728		
10	„	„	0,0658	0,2632	0,2724	0,0743
		„	0,0704	0,2816		
11	Rind	50	0,1575	0,3150	0,3177	0,0867
		„	0,1602	0,3204		
12	Kaninchen	20	0,0630	0,3150	0,3095	0,0844
		„	0,0608	0,3040		

Um festzustellen, ob sich der Gehalt an Restkohlenstoff beim Aufbewahren des Blutes im kalten Raum ändert, wurde das mit Natriumfluorid versetzte Aderlaßblut eines Hundes sofort, nach 24 und nach 48 Stunden untersucht.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Untersucht	ccm	CO_2 g	CO_2 g in 100 ccm	CO_2 Mittel	C Mittel
13	sofort	25	0,0650	0,3250	0,3190	0,0870
		„	0,0626	0,3130		
14	nach 24 St.	40	0,1286	0,3215	0,3167	0,0864
		„	0,1248	0,3120		
15	„ 48 „	25	0,0859	0,3436	0,3478	0,0949
		„	0,0880	0,3320		

Aus den ermittelten Zahlen ergibt sich:

1. der (nicht durch Phosphorwolframsäure fällbare) Restkohlenstoff des Blutes ist bei derselben Tierart sehr annähernd konstant; für den Hund schwankt er von 0,0728 bis 0,0870 g in 100 ccm Blut. Das Mittel ist 0,0780 g.

2. Auch das Blut anderer Säugetiere gibt nahestehende Werte: Pferd 0,0756, Rind 0,0832, Kaninchen 0,0844 g pro 100 ccm Blut.

3. Bei Aufbewahrung in der Kälte ändert sich der Gehalt an Restkohlenstoff in den ersten 24 Stunden nicht merklich.

Nach den vorliegenden Blutanalysen ist anzunehmen, daß an dem Restkohlenstoff der Blutzucker und der Harnstoff einen wesentlichen Anteil haben. Zur genaueren Bestimmung dieses Anteils habe ich in zwei Blutproben neben dem Restkohlenstoff noch den Reststickstoff, den Harnstoff (nach Schöndorff) und den Zucker (nach Pflüger) quantitativ ermittelt.

Versuch 16. Aderlaßblut eines gesunden Hundes.

Für 25 ccm wurden erhalten 0,0760 CO_2, entsprechend 0,3040 in 100 ccm
und 0,0690 „ „ 0,2760 „ 100 „
im Mittel 0,2900;
ferner für 100 ccm 0,0263 g Reststickstoff,[1])
„ 100 „ 0,0400 g Harnstoff, entsprechend 0,0187 g N,
0,0966 g Glucose.

Versuch 17. Aderlaßblut eines Hundes nach 12tägiger Inanition.

Für 25 ccm wurden erhalten 0,0864 g CO_2, entsprechend 0,3456 in 100 ccm
und 0,0944 g „ „ 0,3776 „ 100 „
im Mittel 0,3616 „ 100 „

[1]) Eigentlich nur der nicht durch Phosphorwolframsäure fällbare Anteil des Reststickstoffes.

ferner für 100 ccm 0,0224 Reststickstoff,[1])
„ 100 „ 0,0350 Harnstoff, entsprechend 0,0168 g N,
0,0899 Glucose.

Hiernach entfallen vom Kohlenstoff in 100 ccm Blut auf

Versuch Nr.	Restkohlenstoff g	Glucose g	Harnstoff g	sonstige Stoffe g
16	0,0791	0,0386	0,0080	0,0325
17	0,0986	0,0360	0,0070	0,0556

Somit ist normalerweise etwa die Hälfte des nicht durch Phosphorwolframsäure fällbaren Restkohlenstoffes im Blutzucker vorhanden.

3. Verhalten des Restkohlenstoffes bei Blutverlust, Nierenausschaltung und Phosphorvergiftung.

Versuch 18. Bei einem Hund von 9,40 kg Gewicht werden in 2 Aderlässen mit einem Intervall von $^3/_4$ Stunden je 50 ccm Blut entnommen und durch Natriumfluorid ungerinnbar gemacht.

1. Aderlaß: Je 25 ccm geben 0,0694 und 0,0706 g CO_2, somit pro 100 ccm im Mittel 0,2800 g CO_2, entsprechend 0,0765 C.

2. Aderlaß: Je 25 ccm geben 0,0806 und 0,0834 g CO_2, somit pro 100 ccm im Mittel 0,3280 g CO_2, entsprechend 0,0895 C.

Versuch 19. Einem Hund von 8,500 kg Gewicht werden 70 ccm Blut entzogen, $^3/_4$ Stunden später neuerdings 50 ccm.

1. Aderlaß: Je 25 ccm geben 0,0700 g und 0,0734 g CO_2, somit pro 100 ccm im Mittel 0,2868 g CO_2, entsprechend 0,0782 C.

2. Aderlaß: Je 25 ccm geben 0,0902 und 0,0868 g CO_2, somit pro 100 ccm im Mittel 0,3540 g CO_2, entsprechend 0,0965 C.

In beiden Versuchen tritt die Steigerung im Gehalt an Restkohlenstoff infolge des erlittenen Blutverlustes sehr deutlich hervor. Sie entspricht der unter gleichen Verhältnissen eintretenden Vermehrung des Blutzuckers.

Versuch 20. Beiderseitige Unterbindung der Nierengefäße und der Ureteren bei einem Kaninchen. 1. Aderlaß vor der Ligatur, 2. Aderlaß 38 Stunden danach.

1. Aderlaß: Je 20 ccm geben 0,0588 und 0,0610 g CO_2, somit für 100 ccm im Mittel 0,2995 g CO_2, entsprechend 0,0817 C.

2. Aderlaß: Je 25 ccm geben 0,1274 und 0,1240 g CO_2, somit für 100 ccm im Mittel 0,5028 g CO_2, entsprechend 0,1371 C.

---

[1]) Eigentlich nur der nicht durch Phosphorwolframsäure fällbare Anteil des Reststickstoffes.

Versuch 21. Aderlaß bei einem gesunden Kaninchen. Nach längerer Zeit beiderseitige Ureterenunterbindung. 48 Stunden später 2. Aderlaß.

1. Aderlaß: Je 20 ccm geben 0,0630 und 0,0608 g CO_2, somit für 100 ccm im Mittel 0,3095 g CO_2, entsprechend 0,0844 g C.

2. Aderlaß: Je 25 ccm geben 0,1525 und 0,1400 g CO_2, somit für 100 ccm im Mittel 0,5850 g CO_2, entsprechend 0,1595 g C.

Die Aufhebung der Nierensekretion bewirkt sonach eine sehr bedeutende Vermehrung des Restkohlenstoffes.

Versuch 22. Phosphorvergiftung. Hund, 6,250 kg schwer, erhält täglich 1 ccm einer 1%igen Lösung von Phosphor in Öl subcutan. Aderlaß am 4. Tag. Die Leber zeigt sich wenig verändert; das Blut gerinnt spontan nach 1 Stunde.

Je 25 ccm geben 0,0732 und 0,0712 g CO_2, somit im Mittel für 100 ccm 0,2888 g CO_2, entsprechend 0,0785 g C.

Versuch 23. Phosphorvergiftung. Hund 5,800 kg schwer, erhält jeden 2. Tag 1 ccm von 0,2%igem Phosphoröl. Aderlaß nach der 6. Injektion. Leber stark verändert; Blut ungerinnbar.

Je 25 ccm geben 0,0750 und 0,0770 g CO_2, somit für 100 ccm im Mittel 0,3040 g CO_2, entsprechend 0,0829 g C.

Versuch 24. Phosphorvergiftung. 6 kg schwerer Hund erhält jeden 2. Tag 1 ccm der 0,2%igen Phosphoröllösung. Aderlaß nach der 7. Injektion. Leber hochgradig verändert, das Blut ungerinnbar und reich an Gallenfarbstoff.

Je 25 ccm geben 0,0960 und 0,0838 g CO_2, somit für 100 ccm im Mittel 0,3596 g CO_2, entsprechend 0,0981 g C.

Die Phosphorvergiftung scheint nur bei sehr vorgeschrittener Erkrankung (Versuch 24) eine Steigerung des Gehaltes an Restkohlenstoff zu bedingen.

Anhangsweise seien einige Beobachtungen am Menschenblut angeführt.

Versuch 25. Placentarblut von einer Gesunden.

Je 25 ccm Serum gaben 0,1570 und 0,1606 g CO_2, somit für 100 ccm im Mittel 0,6352 g CO_2, entsprechend 0,1732 g C.

Versuch 26. Placentarblut von einer Gesunden.

Je 20 ccm Serum gaben 0,1340 und 0,1290 g CO_2, somit in 100 ccm im Mittel 0,6575 g CO_2, entsprechend 0,1793 g C.

Versuch 27. Aderlaßblut von einer 23jährigen Urämischen.

Je 25 ccm Serum gaben 0,1976 und 0,1956 g CO_2, somit in 100 ccm im Mittel 0,7864 g CO_2, entsprechend 0,2144 g C.

Die geringe Zahl am Menschenserum ausgeführter Bestimmungen verbietet irgendwelche Schlußfolgerungen. Nur so viel ist zu entnehmen, daß die Methode beim Menschenblut anstandslos ausführbar ist. Die oben angeführten, im Tierexperiment erhaltenen Resultate lassen die Bestimmung des Restkohlenstoffes im pathologischen Blute aussichtsvoll erscheinen. Ich hoffe bald ausführlicher über einschlägige Versuche berichten zu können.

Über die Bangsche Methode der Zuckerbestimmung und die Haltbarkeit der hierzu verwendeten Titerflüssigkeiten.

Von

A. C. Andersen.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 11. April 1910.)

Am Ende des Jahres 1908 veröffentlichte ich das Resultat einer Reihe von Untersuchungen,[1]) wodurch ich beabsichtigte, die Genauigkeit der Bangschen Methode der Zuckerbestimmung und ihre Verwendung zur Bestimmung des Harnzuckers zu beleuchten. Nach Beendigung dieser Arbeit hatte ich eine ziemlich große Menge der Titerflüssigkeiten zurückbehalten, und beschloß alsdann zu untersuchen, wie lange diese bei Aufbewahrung haltbar waren. Zwar ist in der kleinen, in Julius Springers Verlag (Berlin 1908) erschienenen Tafel: „Methode der Zuckerbestimmung" von Dr. Ivar Bang, über die Kupferlösung angeführt: „Die Lösung ist unbegrenzt haltbar," und über die Hydroxylaminlösung: „Auch diese Lösung ist haltbar"; jedoch schien es mir, daß das von H. Jessen-Hansen[2]) hervorgehobene Verhalten — daß nämlich der Titer der Kupferlösung von der Wassermenge abhängig ist, in der das Kupfersulfat aufgelöst wird, ehe es mit der Lösung der anderen Salze gemischt wird — darauf hindeuten könnte, daß in der Lösung eine Reduktion von Cuprisalz zu Cuprosalz vor sich ginge, und daß man deshalb annehmen könne, daß sich jedenfalls die Kupferlösung nicht längere Zeit unveränderlich aufbewahren ließe.

---

[1]) A. C. Andersen, Compt. rend. du lab. de Carlsberg 7, 227, 1908; diese Zeitschr. 15, 76, 1908.

[2]) H. Jessen-Hansen, Compt. rend. du lab. de Carlsberg 7, 218, 1908; diese Zeitschr. 10, 249, 1908.

Eine Entscheidung dieser Frage ließe sich leicht erzielen, wenn man sicher wüßte, daß die Hydroxylaminlösung bei Aufbewahrung haltbar sei; da dieses jedoch nicht als ganz bestimmt gelten konnte, schien es mir am besten, auf die eine oder andere Weise auch diese Lösung zu kontrollieren. Da sie außer Hydroxylaminsulfat noch reichliche Mengen Rhodankalium enthält, läßt der Gehalt von Hydroxylamin sich nicht direkt bestimmen; deshalb habe ich eine reine, wässerige Hydroxylaminlösung als Ausgangsmaterial gewählt, deren Stärke sich zu jeder Zeit auf die von Donath[1]) und Meyeringh[2]) angewiesene Weise bestimmen läßt; mein Verfahren war demnach folgendes: Ich stellte eine reine wässerige Hydroxylaminsulfatlösung her, die in 1 l 2mal soviel Hydroxylaminsulfat enthielt, als Bang angibt, aber kein Rhodankalium, und diese Lösung wurde im Dunkeln zusammen mit den Bangschen Lösungen, die ich prüfen wollte, aufbewahrt. In passenden Zwischenräumen wurde die Stärke der Hydroxylaminsulfatlösung mittels der Fehlingschen Flüssigkeit geprüft; nach einer solchen Bestimmung war es möglich, indem man zu einer abgemessenen Portion der Lösung eine passende Menge von Rhodankalium und Wasser fügte, eine Bangsche Hydroxylaminlösung der richtigen Stärke sich herzustellen; durch Titrierung mit dieser Lösung ließ sich genau bestimmen, ob sich die Kupferlösung geändert hatte. Nachdem auf diese Weise die Stärke der Kupferlösung bestimmt war, wurde diese mit der gewöhnlichen Bangschen Hydroxylaminlösung titriert, die für die Haltbarkeitsprobe aufbewahrt war. Auf diese Weise war es dann möglich, auch diese Lösung zu kontrollieren.

Die Versuche haben sich über ca. $1^1/_2$ Jahr erstreckt; in dieser Zeit hat sich die an einer dunklen Stelle aufbewahrte Bangsche Hydroxylaminlösung nicht im mindesten geändert, während eine Probe, die in einigen Monaten dem Licht ausgesetzt war, merklich abgeschwächt wurde. Es zeigte sich dagegen, daß die Kupferlösung, sowohl wenn sie an heller, als auch wenn sie an dunkler Stelle aufbewahrt wurde — jedoch am meisten im ersteren Falle — ziemlich schnell schwächer wurde. Um die Bedeutung der Abschwächung zu untersuchen, wurden ab und

[1]) Jul. Donath, Ber d. Deutsch. chem. Ges. 10, 766, 1877.
[2]) W. Meyeringh, ibid. 10, 1940, 1877.

zu Zuckerbestimmungen mit reinen Glucoselösungen unternommen; die letzteren wurden durch Auflösen von abgewogenen Mengen Glucose in Wasser hergestellt; das Präparat war im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und nach der von Kjeldahl[1]) angegebenen Methode analysiert, wobei 99,1% Glucose gefunden waren.

1. Versuchsreihe.

24. X. 1908. Von einem Hydroxylaminpräparat (Kahlbaum) mit 93% reinem Hydroxylaminsulfat wurden 14,09 g abgewogen und in Wasser gelöst, die Lösung wurde bis auf 2 l verdünnt. Die Stärke wurde auf folgende Weise bestimmt: 50 ccm Fehlingscher Lösung von normaler Zusammensetzung wurden unter Durchleiten von Wasserstoff 10 Minuten in kochendem Wasser erwärmt und darauf ohne Unterbrechen des Wasserstoffstromes mit 40 ccm der Hydroxylaminsulfatlösung versetzt; nach weiterer 20 Minuten langer Erwärmung wurde das gebildete Kupferoxydul auf einem gewöhnlichen Asbest-Zuckerfilter abfiltriert, mit heißem Wasser rein gewaschen, dann mit Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet, durch Glühen im Wasserstoffstrome reduziert und als metallisches Kupfer gewogen. Es wurden 2 Analysen mit je 40 ccm der Hydroxylaminsulfatlösung ausgeführt, wodurch 0,4041 bzw. 0,4066 g metallisches Kupfer gefunden wurden; da das Hydroxylamin die Fehlingsche Lösung nach folgender Gleichung reduziert:

$$4\,CuO + 2\,NH_2OH = 2\,Cu_2O + N_2O + 3\,H_2O,$$

läßt sich hieraus berechnen, daß 1 l der Lösung 6,52 bzw. 6,56 g reines Hydroxylaminsulfat enthält.

Die Bangsche Hydroxylaminlösung soll nun in 2 l 6,55 g Hydroxylaminsulfat und 200 g Rhodankalium enthalten; wenn man deshalb 20 g Rhodankalium in ca. 75 ccm Wasser löst, 100 ccm der analysierten Lösung hinzufügt und mit Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 200 ccm verdünnt, wird man eine Bangsche Lösung von der richtigen Zusammensetzung bekommen. Eine solche Lösung wird in dem folgenden „die Kontrollösung" genannt werden.

Alle die erwähnten Titrierungsresultate sind Mittelzahlen aus Doppelbestimmungen; der Unterschied zwischen den einzelnen Bestimmungen betrug ein paar Mal 0,7 ccm, war jedoch öfter kleiner, ca. 0,2 bis 0,5 ccm.

50 ccm Kupferlösung erforderten bei der Titrierung 50,1 ccm Kontrollösung.

50 ccm Kupferlösung erforderten bei der Titrierung 50,0 ccm der Bangschen Hydroxylaminlösung.

Danach standen die Lösungen 7 Monate im Dunklen, wonach die Untersuchungen auf dieselbe Weise wiederholt wurden.

---

[1]) J. Kjeldahl, Compt. rend. du lab. de Carlsberg 4, 1, 1895; Zeitschr. f. anal. Chem. 35, 344, 1896.

26. V. 1909. 40 ccm der reinen Hydroxylaminlösung wurden wie oben analysiert; dabei wurden 0,4030 bzw. 0,4041 g Kupfer gefunden; dieses entspricht einem Gehalt von 6,50 bzw. 6,52 g reinen Hydroxylaminsulfats pro Liter. Die Lösung hat sich also nicht geändert, und die Kontrollösung wurde deshalb auf dieselbe Weise wie früher hergestellt.

50 ccm erforderten bei der Titrierung 46,0 ccm Kontrollösung.
50 „ „ „ „ „ 46,8 „ der Bangschen Hydroxylaminlösung.

Die Lösungen wurden jetzt wieder ins Dunkle hingestellt, jedoch wurde von der Kupferlösung eine Probe, A, entnommen, und auf das Fensterbrett gestellt, wo sie morgens einige Stunden den Sonnenstrahlen ausgesetzt war; sämtliche Lösungen standen $^1/_2$ Jahr.

11. XI. 1909. 40 ccm der reinen Hydroxylaminsulfatlösung gaben 0,4066 bzw. 0,4060 g Kupfer, das 6,56 bzw. 6,55 g reinem Hydroxylaminsulfat pro Liter entspricht. Die Kontrollösung wurde wie oben hergestellt.
50 ccm Kupferlösung erforderten bei der Titrierung 40,4 ccm Kontrollösung.
50 „ „ „ „ „ 40,7 „ der Bangschen Hydroxylaminlösung.
50 „ „ A (beleuchtet) erforderten bei der Titrierung 35,8 ccm Kontrollösung.

1,076 g Glucose wurden in Wasser gelöst und die Lösung bis auf 250 ccm verdünnt; 10 ccm enthalten alsdann 43 mg Glucose. Bei der Titrierung nach der Bangschen Methode wurden in 10 ccm 53,4 mg Glucose gefunden, wenn die im Dunkeln aufbewahrte Kupferlösung verwendet wurde, und 60 mg bei Verwendung der beleuchteten Lösung.

Die Lösungen wurden wie früher hergestellt.

19. III. 1910. 40 ccm reinerHydroxylaminsulfatlösung gaben 0,4029 bzw. 0,4047 g Kupfer; dieses entspricht 6,50 bzw. 6,53 g reinen Hydroxylaminsulfats pro Liter. Die Kontrollösung wurde wie früher hergestellt.
50 ccm Kupferlösung erforderten bei der Titrierung 36,4 ccm der Kontrollösung.
50 „ „ „ „ „ 37,3 ccm der Bangschen Hydroxylaminlösung.
50 „ „ A (beleuchtet) erforderten bei der Titrierung 35,9 ccm der Kontrollösung.

1,006 g Glucose wurden inWasser gelöst und die Lösung bis auf 250 ccm verdünnt; 10 ccm enthalten alsdann 40,2 mg Glucose. Die Titrierung ergab 55,2 mg bei Verwendung der im Dunklen aufbewahrten Lösung und 56,5 mg, wenn man die beleuchtete Kupferlösung benutzte.

Diese Versuchsreihe zeigt deutlich, daß die Hydroxylaminlösung haltbar ist, während dieses mit der Kupferlösung nicht der Fall ist. Als sich gezeigt hatte, daß sich die letztere nach dem Verlauf von 7 Monaten sehr geändert hatte, und daß sie sich stets bei längerem Aufbewahren änderte, wurden Anfang

November 1909 neue Lösungen hergestellt, von denen die Kupferlösung in kürzeren Zwischenräumen untersucht wurde, und zwar um zu ermitteln, wie stark sie sich in den ersten Monaten änderte.

2. Versuchsreihe.

11. XI. 1909. 50 ccm Kupferlösung erforderten bei der Titrierung 49,9 ccm der Kontrollösung. (Vgl. 1. Versuchsreihe.)

50 ccm Kupferlösung erforderten bei der Titrierung 50,2 ccm der Bangschen Hydroxylaminlösung.

1,076 g Glucose wurden in Wasser gelöst und die Lösung bis auf 250 ccm verdünnt; davon entsprachen 10 ccm 43,0 mg Glucose. Bei der Titrierung nach Bang wurden 43,4 mg gefunden.

17. XII. 1909. 50 ccm Kupferlösung erforderten 49,8 ccm der Bangschen Hydroxylaminlösung. 1,009 g Glucose wurden in Wasser gelöst und die Lösung bis auf 250 ccm verdünnt; von diesen enthalten also 10 ccm 40,4 mg Glucose. Die Titrierung ergab 40,9 mg.

16. I. 1910. 50 ccm Kupferlösung erforderten 49,5 ccm der Bangschen Hydroxylaminlösung. Bei Titrierung von 10 ccm Zuckerlösung mit einem Inhalt von 40,0 mg Glucose wurden 40,8 mg vorgefunden.

14. II. 1910. 50 ccm Kupferlösung entsprachen 48,7 ccm Hydroxylaminlösung. Bei Titrierung der 10 ccm Zuckerlösung mit 44,1 mg Glucose fand man 45,5 mg.

19. III. 1910. 50 ccm Kupferlösung erforderten bei der Titrierung 47,6 ccm der Kontrollösung. (Vgl. 1. Versuchsreihe.)

50 ccm Kupferlösung erforderten bei der Titrierung 48,0 ccm der Bangschen Hydroxylaminlösung.

1,006 g Glucose wurden in Wasser gelöst und die Lösung bis auf 250 ccm verdünnt. 10 ccm enthalten alsdann 40,2 mg Glucose. Bei der Titrierung fand man 42,2 mg Glucose.

Während sich die Hydroxylaminlösung haltbar zeigte, wenn man sie im Dunklen aufbewahrte, so war dieses nicht mehr der Fall, wenn sie dem Lichte ausgesetzt wurde. Im November hatte ich ca. $^1/_2$ l in einer durchsichtigen Flasche auf ein Fensterbrett gestellt, und während am 19. III. 50 ccm Kupferlösung von der im Dunklen aufbewahrten Hydroxylaminlösung 48 ccm erforderten, um umzuschlagen, so mußten von der beleuchteten Hydroxylaminlösung 51,3 ccm dazu verwendet werden, trotzdem die beiden Lösungen im November dieselbe Stärke hatten. Dieses zeigt deutlich, daß die Hydroxylaminlösung nur haltbar ist, wenn sie im Dunklen aufbewahrt wird.

Das Resultat der hier beschriebenen Versuche ist demnach kurz folgendes: Die für die Bangsche Methode der Zuckerbestimmung erforderlichen Titerflüssigkeiten müssen im Dunkeln aufbewahrt werden; auch unter diesen Umständen ändert sich indessen die Kupferlösung, indem ihr Gehalt an Cuprisalz sich

vermindert, da aber die Hydroxylaminlösung, wie oben erwähnt, haltbar ist, so wird man zu jeder Zeit durch eine erneuerte Einstellung bestimmen können, um wieviel sich die Kupferlösung geändert hat. Nach und nach, wenn die Lösung abgeschwächt wird, geben die Glucosebestimmungen zu hohe Resultate, und der Fehler wird desto größer, je älter die benutzte Kupferlösung ist; der Fehler läßt sich nicht durch Berechnung eliminieren, wenn man auch den Titer der Kupferlösung kennt. Wie alt die Kupferlösung noch sein darf, hängt deshalb von der verlangten Genauigkeit des Resultates ab; bei der Verwendung der Methode für Harnzuckerbestimmungen kann man ganz ruhig bis 3 Monate alte Lösungen benutzen, indem der hierdurch verursachte Fehler ganz ohne Bedeutung ist.

In einer Abhandlung über die quantitativen Bestimmungen der Glucose des Blutes hat neulich B. Oppler[1]) einige Kontrolluntersuchungen über die Bangsche Methode mitgeteilt, und ich kann nicht unterlassen, diese zu berühren. Es werden hier einige Doppelbestimmungen angeführt, und bei einigen von diesen ist bei zwei Analysen derselben Zuckerlösung der Verbrauch an Hydroxylaminlösung um mehrere Kubikzentimeter verschieden; einen solchen Unterschied habe ich niemals gefunden, trotzdem ich sehr viele Doppelbestimmungen ausgeführt habe; ich kann mir diese Fehler nur dadurch erklären, daß die von Bang gegebenen Versuchsbedingungen nicht ganz befolgt worden sind. Wenn Oppler findet, daß die am Schluß der Titrierung anderer als reiner wässeriger Zuckerlösungen auftretende grüne Farbe eine Hauptschwierigkeit des Verfahrens ist, so muß ich dazu sagen, daß dieses Verhalten meiner Meinung nach ein Vorteil ist, weil man dann die Hydroxylaminlösung schnell hinzufügen kann, ehe sich die grüne Farbe zeigt; wenn dieses erfolgt ist, sind nur ganz wenige Kubikzentimeter Hydroxylaminlösung erforderlich, um den Endpunkt der Titrierung zu erreichen. Wenn man auf diese Weise titriert, hat man die Zeit vollständig in seinem Belieben, die deshalb keinen Fehler veranlassen kann.

Weiterhin hebt Oppler hervor, daß die Hydroxylaminlösung nicht haltbar ist, da sie schon nach 3 Wochen einen

[1]) B. Oppler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 393, 1910.

geringen Bodensatz ablagert und gleichzeitig anfängt, schwach nach Schwefelwasserstoff zu riechen. Ich habe oft Gelegenheit gehabt, diese Erscheinung zu beobachten; es hat sich aber gezeigt, daß sie gar keinen Einfluß auf den Titer der Lösung ausübt; sie ist deshalb wahrscheinlich einem geringen Zerfall des anwesenden Rhodankaliums zuzuschreiben. Was die Bertrandsche Methode betrifft, kann ich in allem darauf hinweisen, was ich früher über diese Methode geschrieben habe. Betreffend Opplers Bemerkungen zu meinen Einwendungen gegen die Methode sei nur angeführt, daß ich natürlich keinen Augenblick — wie Oppler zu meinen scheint — daran gedacht habe, die Reduktion ohne Zutritt von Luft auszuführen und trotzdem das Resultat nach den Bertrandschen Tabellen zu berechnen. Wenn man die Operationen ohne Zutritt von Luft ausführen will — und dieses meine ich immer noch wäre das richtigste —, so muß man natürlicherweise hier ebenso wie bei den Zuckerbestimmungen nach Kjeldahl neue Tabellen ausarbeiten.

Ich kann schließlich nicht unerwähnt lassen, daß die genaueste Methode für Zuckerbestimmungen die von Kjeldahl[1]) ausgearbeitete ist, daß aber die Bangsche Methode ihrer leichten Ausführbarkeit wegen vortreffliche Dienste leisten kann, besonders wenn von vergleichenden Untersuchungen die Rede ist.

Nachdem obiges geschrieben war, hat C. Neuberg[2]) eine Reihe von kleineren Mitteilungen verschiedenen Inhalts veröffentlicht, von denen eine die Verwendung von Bleiacetat oder Mercurinitrat als Klärungs- und Entfärbungsmittel des Harns behandelt. Neuberg bespricht in diesem Zusammenhang nur die polarimetrische Bestimmung und gibt hier als Resultat an, daß für gewöhnliche Zuckerharne die Entfärbung mit Bleiacetat völlig ausreicht.

In einer Abhandlung[3]) habe ich in dieser Zeitschrift vor anderthalb Jahren dieselbe Frage behandelt und durch eine Reihe von Analysen zuckerhaltiger Harne ebenfalls gezeigt, daß man bei

---

[1]) J. Kjeldahl, l. c.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 24, 423, 1910.

[3]) A. C. Andersen, l. c.

polarimetrischen Zuckerbestimmungen ungefähr dasselbe Resultat bekommt, sei es, daß der Harn mit Bleiacetat oder mit Mercurinitrat geklärt ist; dasselbe gilt auch für die Bestimmungen mittels alkalischer Kupferlösungen, obwohl hier das Mercurinitrat richtigere Resultate gibt, weil etwas mehr von den normalen reduzierenden Harnbestandteilen durch Mercurinitrat als durch Bleiacetat gefällt wird. Der Hauptvorteil des Mercurinitrats liegt darin, daß man fast immer völlig klare und farblose Lösungen bekommt, auch wenn der Harn sehr dunkel gefärbt ist (z. B. durch die Anwesenheit von Blut- oder Gallenfarbstoffen); dabei ist die Anwendung desselben nicht so umständlich, wie es nach den Angaben Denigès' aussieht, — so fordert z. B. die Entquecksilberung nicht 1 Stunde, sondern ist immer nach 10 Minuten beendet. Daß die „notwendigen großen Harnmengen", die man benutzen muß, das Verfahren unbequem machen sollten, kann ich mir nicht vorstellen, denn 50 ccm Harn reichen völlig aus.

Bei Anwendung des Mercurinitrats wird der Harn bis auf das doppelte Volumen verdünnt, indem 50 ccm Harn mit 25 ccm der Quecksilberlösung versetzt werden und das Ganze danach mit 10%iger Natronlauge neutralisiert und mit Wasser bis auf 100 ccm verdünnt wird. Um die Neutralisation und die Verdünnung zu umgehen, schlägt Neuberg vor, gegebenenfalls statt Mercurinitrat Mercuriacetat zu benutzen, da dieses sich genau wie Bleiacetat ohne weiteres in fester Form verwenden läßt; dies dürfte eine wesentliche Verbesserung sein.

Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff im Blut.

Von

C. G. L. Wolf und Mc Kim Marriot.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Cornell Univers. Medical College New York City.)

(Eingegangen am 29. April 1910.)

Die Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff im Blut bildet die Grundlage für eine Reihe von Fragen des intermediären Stickstoffumsatzes. Da es unsere Absicht war, ältere Angaben zu kontrollieren, haben wir uns entschlossen, die Methoden der früheren Autoren anzuwenden und sie möglichst so zu modifizieren, daß sie an Bequemlichkeit und Genauigkeit gewannen. Im Verlaufe unserer Untersuchung gelangten wir zu einem Verfahren, das die Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff in derselben Blutprobe gestattet. Dies ist, so weit wir sehen, bisher nicht möglich gewesen. Die angewandten Ausführungen sind nicht neu, aber die Art der Anstellung erhöht ihre Genauigkeit.

Zur Bestimmung von Ammoniak in Blut und Geweben sind bisher zwei Methoden in Gebrauch; einmal das Schlösingsche Verfahren, das sehr unbefriedigende Ergebnisse liefert, zweitens die Methode von Nencki und Zaleski[1]), bei der das Blut mit Alkalizusatz im Vakuum destilliert wird. Dies letzte Verfahren wird von Beccari[2]) mit der Modifikation benutzt, das Blut Tropfen für Tropfen in den Destillationskolben fallen zu lassen; Beccari wendet kein Alkali an, und findet infolgedessen niedrigere Werte als Nencki und die Benutzer seiner Methode.

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 37, 26.

[2]) Biochem. Centralbl. 5, 460, 1906.

Das Nenckische Verfahren wurde verbessert durch Zugabe von Methyl- oder Äthylalkohol, die den Siedepunkt der Blutflüssigkeit erniedrigen, und durch einen Zusatz von Natriumcarbonat sowie Kochsalz. Dies letzte Verfahren hat jüngst Grafe[1]) auf Thierfelders Veranlassung angewandt.

Unser Verfahren ist in vieler Hinsicht dem von Grafe und dem von Shaffer[2]) zur Bestimmung von Ammoniak im Harne ähnlich.

Vor der Ermittlung von Ammoniak und Harnstoff im Blut müssen die anderen stickstoffhaltigen Substanzen so weit wie möglich entfernt werden. Wir erreichen dies in folgender Weise:

Das Blut wird durch heftiges Schlagen defibriniert, dann durch Glaswolle und schließlich durch Leinentuch filtriert. Zu 100 ccm dieses Blutes setzt man 50 ccm gesättigte Chlornatriumlösung und dann unter dauerndem Rühren 250 ccm Methylalkohol. Zum Schluß hat man einen körnigen roten Niederschlag. Die Flüssigkeit wird dann durch einen von Löbenschen Drucktrichter filtriert. Man erhält 200 ccm klares, schwach gelbliches Filtrat, das beim Erhitzen mit Essigsäure keinen Niederschlag gibt. Beim Stehen im Eisschrank fällt in der Regel ein geringer bräunlicher Niederschlag aus, der abfiltriert wird. In einer Reihe Gesamtstickstoffbestimmungen des Filtrates fanden wir 0,08 g Stickstoff für 100 ccm ursprüngliches Blut. Dieses Filtrat wurde für die Ammoniak- und Harnstoffbestimmung benutzt.

Für die Ammoniakbestimmung wurden 100 ccm des in der angegebenen Weise gewonnenen Filtrates in einen 500 ccm-Kjeldahlkolben gebracht, der einen modifizierten Hempelschen Aufsatz trug. Nach Zusatz von 10 ccm 2 n-Sodalösung wurde der Kolben in ein Wasserbad gesenkt. Vor dem Evakuieren wurden einige Bimssteinstückchen zugesetzt. Das Destillat wurde in zwei Drechselschen Flaschen aufgefangen, die zusammen 25 ccm $^{n}/_{50}$-Schwefelsäure enthielten und mit kaltem Wasser gekühlt wurden. Eine dritte Drechselsche Waschflasche war zur Sicherheit zwischengeschaltet und stand mit der Wasserstrahlpumpe in Verbindung. Die Destillation dauerte bei 40 bis 50° 40 Minuten. Der größte Teil des Alkohols destilliert

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 300, 1906.

[2]) Amer. Journ. of Physiol. 8, 330, 1903.

ab. Der Inhalt beider Vorlagen wird vereint, zur Austreibung der Kohlensäure einige Minuten im Sieden erhalten und mit Natronlauge[1]) mit alizarinsulfosaurem Natrium als Indicator titriert. Wir fanden, daß durch Zusatz von mehr Alkohol oder Wasser und nochmalige Destillation des Kjeldahlkolbeninhaltes bei 60° kein Ammoniak weiter abgegeben wird, selbst wenn die Lösungen erheblich Harnstoff enthalten.

Der Rückstand im Kjeldahlkolben diente zur Harnstoffbestimmung. Wir wandten zwei Methoden an, die Spaltung durch Chlormagnesium nach Folin oder die durch Phosphorsäure nach Pflüger-Schöndorf.

Bei dem ersten Verfahren wird der Kjeldahlkolbeninhalt in einen 250 ccm-Erlenmeyerkolben überführt und mit 5 ccm 5 n-Salzsäure angesäuert; dann setzt man 20 g Magnesiumchlorid, ein kleines Stück Paraffin und einige Tropfen alizarinsulfosaures Natron hinzu. Der Kolben wird mit einem Folinschen Kondensator versehen und auf einer elektrischen Heizplatte bei niederer Temperatur erhitzt, bis der Kolbeninhalt ungefähr 50 ccm beträgt. Die im Folinschen Kondensator sich ansammelnde Flüssigkeit wird sorgfältig herausgespült und in den später zu benutzenden Destillationskolben getan. Der Kolben wird dann auf der elektrischen Heizplatte 2 Stunden lang höher erhitzt, doch so, daß der Inhalt nicht zur völligen Trockenheit eingeengt wird. Der Rückstand wird in einen Kjeldahlkolben übergeführt, mit 15 ccm 20%iger Natronlauge versetzt und unter Vorlegung von $^n/_{50}$-Schwefelsäure destilliert. Das Destillat wurde zum Sieden erhitzt, abgekühlt und mit $^n/_{50}$-ätzalkalifreiem Natriumcarbonat titriert. Für den geringen Ammoniakgehalt der Reagenzien wurden Korrekturen angebracht.

Bei der zweiten Harnstoffbestimmungsmethode wurden 10 g Phosphorsäure in Stangen zu dem Kjeldahlkolbeninhalt gefügt, der bei der Ammoniakdestillation zurückgeblieben war. Der Kolben wurde dann 5 Stunden lang im Luftbade auf 150 bis 170 g erhitzt. Der Kolben wurde abgekühlt, sein Inhalt in warmem Wasser gelöst, mit Natronlauge alkalisch gemacht, destilliert und wie vorher titriert.

[1]) Die Natronlauge war aus metallischem Natrium hergestellt und wurde zur Fernhaltung von Kohlensäure in einer paraffinierten Flasche mit Natronkalkverschluß aufbewahrt.

Die Resultate waren folgende:

Versuch 1. Zu zwei Portionen à 100 ccm defibrinierten Blutes wurden 0,10 g Harnstoff und 0,05 g Chlorammonium gefügt. Zu zwei anderen Portionen desselben Blutes — überall frisches Rinderblut — wurde nichts zugesetzt. Die Proben wurden dann in der angegebenen Weise analysiert, der Harnstoff nach Folin. Überall wurden Doppelbestimmungen ausgeführt.

Tabelle I.

100 ccm Rinderblut + 50 ccm gesättigte Kochsalzlösung + 250 ccm Methylalkohol; 100 ccm des Filtrates = 25 ccm Blut dienten zur Bestimmung.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	NH_3-Stickstoff in 100 ccm Blut
1	25,0	22,3	0,3	2,4	0,0027
2	25,0	22,3	0,3	2,4	0,0027
3	25,0	22,5	0,3	2,2	0,0025
4	25,0	22,5	0,3	2,2	0,0025

Tabelle II.

100 ccm desselben Rinderblutes + 50 ccm gesättigter NaCl-Lösung + 250 ccm Methylalkohol + 0,05 g Ammoniumchlorid + 0,10 g Harnstoff; 100 ccm Filtrat = 25 ccm Blut.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	NH_3-Stickstoff in 100 ccm Blut	Berechnet	Differenz
1	25,0	21,6	0,3	3,1	0,0035	0,0039	0,0006
2	25,0	21,8	0,3	2,9	0,0033	0,0039	0,0006
3	25,0	21,7	0,3	3,0	0,0034	0,0039	0,0005
4	25,0	21,9	0,3	2,8	0,0032	0,0039	0,0007

Tabelle III.

Blutrückstand (der Tabelle I) nach Folins Methode hydrolysiert.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	Harnstoff-N in 100 ccm Blut
1	25,0	14,2	4,4	6,4	0,0074
2	25,0	13,8	4,4	6,8	0,0078

Tabelle IV.

Rückstand von Blut (der Tabelle II), nach Folins Methode hydrolysiert.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	Harnstoff-N in 100 ccm Blut	Berechnet	Differenz
1	100,0	48,6	4,4	47,0	0,054	0,0536	0,0004
2	100,0	49,7	4,4	45,9	0,053	0,0536	0,0006
3	100,0	52,6	4,4	43,0	0,049	0,0536	0,0046
4	100,0	51,5	4,4	44,1	0,051	0,0536	0,0026

Versuch 2. Zu je zwei Proben à 100 ccm Rinderblut wurden 0,0095 g Chlorammonium und 0,03 g Harnstoff gesetzt; zu zwei anderen Proben desselben Blutes wurde nichts hinzugefügt.

Tabelle V.

100 ccm Rinderblut + 50 ccm NaCl-Lösung + 250 ccm Methylalkohol; 100 ccm Filtrat = 25,0 ccm Blut.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	NH_3-Stickstoff in 100 ccm Blut
1	25,0	23,2	0,5	1,3	0,0015
2	25,0	23,3	0,5	1,2	0,0014
3	25,0	23,3	0,5	1,2	0,0015
4	25,0	23,3	0,5	1,2	0,0015

Tabelle VI.

Dasselbe Blut (der Tabelle V) + 0,0095 g Ammoniumchlorid + 0,03 g Harnstoff + 50 ccm Chlornatriumlösung + 250 ccm Methylalkohol; 100 ccm Filtrat = 25 ccm Blut.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	NH_3-Stickstoff in 100 ccm Blut	Berechnet	Differenz
1	25,0	21,1	0,5	3,4	0,0039	0,0039	0,0000
2	25,0	21,1	0,5	3,4	0,0039	0,0039	0,0000
3	25,0	21,1	0,5	3,4	0,0039	0,0039	0,0000
4	25,0	21,2	0,5	3,3	0,0038	0,0039	0,0001

Tabelle VIa.

Rückstand des Vorangehenden, mit H_3PO_4 hydrolysiert.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	Harnstoff-N in 100 ccm Blut
1	25,0	13,9	0,9	10,2	0,012
2	25,0	13,9	0,9	10,2	0,012
3	25,0	14,0	0,9	10,1	0,012

Tabelle VII.

Das gleiche Rinderblut (der Tabelle VI u. VIa) + 0,0095 g Ammoniumchlorid + 0,03 g Harnstoff + 50 ccm gesättigter NaCl-Lösung + 250 ccm Methylalkohol; 100 ccm Filtrat = 25 ccm Blut.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	NH_3-Stickstoff in 100 ccm Blut	Berechnet	Differenz
1	25,0	18,0	0,5	6,5	0,0075	0,00735	0,00015
2	25,0	18,0	0,5	6,5	0,0075	0,00735	0,00015
3	25,0	18,1	0,5	6,4	0,0074	0,00735	0,00005
4	25,0	18,1	0,5	6,4	0,0074	0,00735	0,00005

Versuch 3. Andere Blutproben, aber dieselben Mengen Chlorammonium und Harnstoff wie bei Versuch 2. Harnstoffbestimmung nach der Phosphorsäuremethode.

Tabelle VIII.

100 ccm normales Rinderblut + 50 ccm gesättigter Kochsalzlösung + 250 ccm Methylalkohol; 100 ccm Filtrat = 25 ccm Blut.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	NH_3-Stickstoff in 100 ccm Blut
1	25,0	20,3	0,5	4,2	0,0048
2	25,0	20,3	0,5	4,2	0,0048
3	25,0	20,2	0,5	4,3	0,0049
4	25,0	20,2	0,5	4,3	0,0049

Tabelle VIIIa.

Rückstand des Materials von Tabelle VII mit H_3PO_4 hydrolysiert.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	Harnstoff-N in 100 ccm Blut	Berechnet	Differenz
1	25,0	5,0	0,9	19,1	0,022	0,026	0,004
2	25,0	4,8	0,9	19,3	0,022	0,026	0,004
3	25,0	5,0	0,9	19,1	0,022	0,026	0,004
4	25,0	4,5	0,9	19,6	0,022	0,026	0,004

Versuch 4. Wiederholung des Versuches 3 mit demselben Blut, aber unter Zugabe von 0,2 g Glykokoll.

Tabelle IX.

100 ccm desselben Blutes (wie Tabelle VIII) + 0,2 g Glykokoll + 50 ccm gesättigter NaCl-Lösung + 250 ccm Methylalkohol; 100 ccm Filtrat = 25 ccm Blut.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	NH_3-Stickstoff in 100 ccm Blut	Berechnet	Differenz
1	25,0	20,2	0,5	4,3	0,0049	0,00485	0,00005
2	25,0	20,3	0,5	4,2	0,0049	0,00485	0,00005

Rückstand des Voraufgehenden, mit H_3PO_4 hydrolysiert.

Versuch	$^n/_{50}$-H_2SO_4 ccm	$^n/_{50}$-NaOH ccm	Korrektur	Differenz	Harnstoff-N in 100 ccm Blut	Berechnet	Differenz
1	25,0	10,8	0,9	13,3	0,015	0,012	0,003
2	25,0	11,4	0,9	12,7	0,015	0,012	0,003

Die Tabelle zeigt, daß Glykokoll bei der Ammoniakbestimmung überhaupt nicht, und bei der Harnstoffbestimmung mittels Phosphorsäure nur in Spuren zersetzt wird.

Zusammenfassung: Die beschriebene Methode ermöglicht die Bestimmung des Ammoniaks im Blut mit beträchtlicher Genauigkeit. Die Resultate für Harnstoff sind nicht ganz so befriedigend, wahrscheinlich infolge Bildung von Huminsubstanzen, die eine vollkommenen Hydrolyse verhindern.

Über eine Antiprotease im Hefepreßsaft.

Von

Eduard Buchner und Hugo Haehn.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 15. April 1910.)

Außer den Agenzien, welche die Spaltung des Zuckermoleküles wahrscheinlich über Zwischenprodukte hinweg, in Alkohol und Kohlendioxyd bewirken und in der folgenden Abhandlung wieder unter dem Sammelnamen Zymase zusammengefaßt werden sollen,[1]) bedarf es zur Einleitung des Gärungsvorganges noch der Gegenwart eines besonderen Hilfsstoffes, des sog. Ko-Enzyms.[2]) Diese letztere Substanz ist dialysabel und im Gegensatz zu den eigentlichen Enzymen ziemlich kochfest, so daß sie sich in Kochsaft, durch Ausziehen von Hefe mit siedendem Wasser oder durch Aufkochen von frischem Hefepreßsaft gewonnen, noch unverändert vorfindet; vermutlich stellt sie einen organischen Phosphorsäureester vor. Der Umfang der Gärwirkung eines Preßsaftes wird außerdem durch den Gehalt an Endotryptase[3]), einem Enzym, das die Zymase durch Verdauung zerstört,[4]) reguliert.

In unserer letzten Mitteilung[5]) wurde gezeigt, daß beim einfachen Lagern des Hefepreßsaftes, wobei derselbe seine Gärwirkung verliert, zuerst das Ko-Enzym verschwindet, wahrscheinlich unter dem Einfluß von Lipasen des Preßsaftes,

[1]) Vgl. diese Zeitschr. 19, 191, 1909.

[2]) A. Harden und W. Young, Die Literaturstellen sind zitiert: Diese Zeitschr. 8, 520, 522, 1908.

[3]) M. Hahn, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 31, 200, 1898.

[4]) E. Buchner, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 30, 1111, 1897.

[5]) Buchner und Haehn, diese Zeitschr. 19, 191, 1909.

während die Zymase selbst anfangs noch erhalten bleibt. Solchen Saft kann man durch Kochsaftzusatz regenerieren, d. h. von neuem zur Zuckervergärung fähig machen. Verzögert sich aber der Kochsaftzusatz zu lange, so ist auch die Zymase zerstört; die Zugabe bleibt dann ohne Wirkung. Fügt man andrerseits zu Preßsaft von vornherein Kochsaft, so erhält sich die Gärwirkung mehrere Tage sehr vollständig. Der Kochsaft schützt demnach die Zymase vor dem verderblichen Einfluß des proteolytischen Enzyms.

Im folgenden beschriebene Versuche haben nun ergeben, daß der Kochsaft nicht nur die Zymase, sondern auch die gerinnbaren Eiweißkörper des Preßsaftes vor dem Abbau durch die Endotryptase bewahrt (Tabelle I), daß er ferner Gelatine vor der Verflüssigung durch die Endotryptase des Preßsaftes schützt (Tabelle II) und daß er endlich auch das Casein der Milch trotz Zusatz von Tryptase einige Zeit hindurch unverdaut erhält (Tabelle III). Der Kochsaft konserviert also die Zymase, die gerinnbaren Eiweißkörper des Hefepreßsaftes, die Gelatine und das Milchcasein. Diese Stoffe gehören somit einer Gruppe an, da sie sich ähnlich verhalten. Die Zymase ist demnach mit großer Wahrscheinlichkeit der Klasse der Proteinstoffe zuzurechnen.

Wie sich weiter zeigte, schützt der Hefekochsaft Gelatine nicht nur gegen die Endotryptase des Hefepreßsaftes, sondern auch gegen Verflüssigung durch Pepsinase[1]) und Tryptase (Tabelle IV). Es handelt sich demnach nicht um die Gegenwart eines spezifischen Schutzstoffes gegen Endotryptase, sondern allgemein gegen proteolytische Enzyme.

Unsere frühere einfachste Vermutung, daß die konservierende Wirkung des Kochsaftes für Zymase auf den Gehalt an Ko-Enzym zurückzuführen sei,[2]) läßt sich somit nicht länger aufrecht erhalten. Man wird vielmehr zur Annahme eines

---

[1]) Als Peptasen sollen nach einem Vorschlag von E. Abderhalden und C. Oppenheimer (vgl. des letzteren Lehrbuch „Die Fermente", 2, 3. Aufl., 120 Anm., 122 Anm., 1909) in Zukunft nur mehr speziell die Pepton spaltenden Enzyme bezeichnet werden, wogegen die pepsinähnlichen Agenzien des Tier- und Pflanzenkörpers Pepsinasen genannt werden.

[2]) Diese Zeitschr. 19, 196, 193, 1909.

besonderen Schutzstoffes gegen verdauende Einflüsse im Kochsaft genötigt, der als Antiprotease bezeichnet sei.

Ausführliche Versuche haben gezeigt, daß man das Ko-Enzym des Kochsaftes zerstören kann, ohne die Antiprotease zu vernichten. Es gelingt dies zunächst durch mehrstündiges Kochen am Rückflußkühler; der so behandelte Kochsaft vermag sog. ausgegorenen Hefepreßsaft, der nach Ausübung der Gärwirkung auf Zucker unwirksam geworden ist, nicht mehr zu regenerieren, da das Ko-Enzym fehlt; dagegen zeigt er noch Schutzwirkung für Gelatine (Tabelle V) und für die Zymase des lagernden Preßsaftes (Tabelle VI). Ähnliches läßt sich durch Erhitzen des Kochsaftes mit verdünnter Schwefelsäure (Tabelle VII) oder durch Behandeln mit Potasche bei 37° (zweiter Teil der Tabelle IX) erreichen, wobei das Ko-Enzym fast völlig verschwindet, während die Antiprotease in günstigen Fällen größtenteils erhalten bleibt.

Trennungsversuche der Antiprotease und des Ko-Enzyms durch Auskochen der pulverigen Alkohol-Äther-Fällung des Kochsaftes mit Methylalkohol sind vorläufig ohne Ergebnis geblieben; der unlösliche Rückstand enthielt die beiden Substanzen (Tabelle VIII). Ebenso hat sich gezeigt, daß Ricinuslipase sowohl Ko-Enzym als Antiprotease zerstört (Tabelle IX); letztere dürfte daher derselben Körpergruppe angehören wie das Ko-Enzym. Beide Substanzen, Hilfsstoffe zur Regelung der Enzymwirkung in den Hefezellen, die aber im Gegensatz zu den eigentlichen Enzymen thermostabil oder kochfest sind, werden durch Lipasen leicht verändert.

Die Verflüssigung der Gelatine durch Endotryptase wird durch erhebliche Zusätze von Essigsäure gehindert (s. Tab. X), wie man aus den Feststellungen von M. Hahn[1]) schon vermuten konnte. Daß es sich aber bei der antiproteolytischen Wirkung des Kochsaftes nicht etwa nur um die schwach saure Reaktion desselben handelt, beweisen besondere Versuche, welche die hemmende Wirkung von neutralisiertem Kochsaft auf Endotryptase feststellen (s. Tabelle XI).

Über die chemische Natur des antiproteolytischen Agens geben tastende Versuche einigen Anhalt, ausgeführt mit Koch-

[1]) M. Hahn und L. Geret, Zeitschr. f. Biol. 40, 117. — E. und H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, 1903, S. 318.

saftfällung, die natürlich neben der Antiprotease noch das Ko-Enzym und jedenfalls sehr viele andere Stoffe enthält. Nachgewiesen wurde Phosphorsäure, dann eine Pentose, ursprünglich wohl nicht als solche vorhanden, aber nach dem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure durch Furolreaktionen des Destillates sich verratend, endlich Aminosäuren, erkannt bisher allerdings nur durch den Aldehydgeruch, der beim Erwärmen mit stark alkalischer Hypochloritlösung nach K. Langheld[1]) auftritt. Eiweißreaktionen verliefen dagegen negativ.

Aminosäuren dürften nach unseren vorläufigen Versuchen kaum das Agens vorstellen. Durch Zusatz von Alanin, Leucin oder Tyrosin konnte weder die Verflüssigung der Gelatine durch Endotryptaselösung verzögert (Tabelle XII), noch die Zymase im lagernden Preßsaft konserviert werden (Tabelle XIII). Da die wirksamen Stoffe der Kochsaftfällung, wie wir uns überzeugten, durch Glühen zerstört und durch Überhitzen mit Wasser unter Druck nach besonderen Versuchen vernichtet werden (s. Tabelle XIV), so scheint es sich um einen organischen, verseifbaren, esterähnlichen Stoff zu handeln, womit das schon besprochene Verhalten gegen Lipasen übereinstimmt.

Die Antiprotease entsteht nicht erst bei der Herstellung des Kochsaftes aus der Hefe, also durch Einwirkung von Wasser bei Siedetemperatur. Sie konnte vielmehr im kalt bereiteten und dann im Vakuum eingedampften wässerigen Auszug aus Acetondauerhefe, welche die Inhaltsstoffe der lebenden Zellen möglichst unverändert enthält, nachgewiesen werden (Tabelle XV). Die Antiprotease spielt daher wahrscheinlich eine hervorragende Rolle im Leben der Hefe, da sie die Verdauungsvorgänge regelt.

Endlich waren wir noch bestrebt, Aufschluß über die Wirkungsweise der Antiprotease zu gewinnen. Wirkt sie schützend auf Gelatine, indem sie sich mit der Endotryptase, dem verflüssigenden Agens, verbindet? Nach den Versuchen der Tabelle XVII gelingt es nicht, durch Aufschichten einer Endotryptaselösung auf Kochsaft-Gelatine nachweisbare Anteile des proteolytischen Agens herauszunehmen; die nach ein bis zwei Wochen wieder abgegossene Lösung hat noch die ursprüng-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 52, 2360, 1909.

liche verflüssigende Wirkung auf Gelatine. Der schützende Einfluß der Antiprotease scheint somit eher durch eine Bindung zwischen Antiprotease und Gelatine zustande zu kommen, eine Vorstellung, die noch dadurch an Wahrscheinlichkeit gewinnt, daß, wie schon oben erwähnt, der Schutz nicht nur gegen Endotryptase, sondern auch gegen Pepsinase und Tryptase erfolgt.

Die Ergebnisse in ihrer Gesamtheit zwingen dazu, in der Hefezelle ein neues hypothetisches Agens, die Antiprotease, anzunehmen. Leider sind eben unsere Kenntnisse noch nicht so weit vorgeschritten, daß eine Vereinfachung der Vorstellungen, gewiß das erstrebenswerte Ziel, möglich wäre.

Die Ausführung der Versuche ist uns durch Lieferung ausgezeichneter untergäriger Bierhefe durch die Haase-Brauerei in Breslau sehr erleichtert worden, wofür wir Herrn Geh. Kommerzienrat E. Haase auch hier unsern Dank zum Ausdruck bringen.

Experimentelles.

Die Darstellung des für die Versuche verwendeten Kochsaftes aus Hefe wurde stets nach den früheren Angaben bewerkstelligt.[1]) In den meisten Fällen kam konzentrierter Kochsaft, d. h. im Vakuum bei 30° auf ein Viertel seines Volumens eingedampfter Kochsaft zur Verwendung. Die Gärkraftbestimmungen wurden in der schon mehrmals erwähnten Weise[2]) auf gewichtsanalytischem Wege ausgeführt. Die Versuchstemperatur war immer 22°.

Konservierung der Zymase und des koagulierbaren Eiweißes durch Kochsaft.

Die Tabelle I gibt 3 Versuche wieder, von denen die beiden ersten mit Berliner, der dritte mit Breslauer untergäriger Bierhefe unter den gleichen Ergebnissen angestellt sind. Die linke Hälfte der Tabelle zeigt, daß die Zymase beim Lagern des Preßsaftes bei 22° verschwindet, aber durch Kochsaftzusatz erhalten werden kann. Mit Kochsaft aufbewahrter Preßsaft besitzt nach einem bzw. einigen Tagen auf Zucker-

[1]) Diese Zeitschr. 19, 198, 1909.
[2]) Ebenda, S. 197.

zusatz noch Gärwirkung, die nach mehrtägigem Lagern durch von neuem wiederholten Kochsaftzusatz wesentlich erhöht wird (Hauptversuche). Dagegen zeigt ohne Kochsaft lagernder Preßsaft (Kontrollversuche) schon nach 1 Tag keine Gärwirkung mehr und läßt sich auch durch nachträglichen Kochsaftzusatz nicht mehr regenerieren; es fehlt eben die Zymase. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Versuchen.[1])

Die rechte Hälfte der Tabelle bringt nun das Neue, nämlich die Beweise für die Eigenschaft des Kochsaftes, beim Lagern mit Preßsaft die gerinnbaren Eiweißkörper des letzteren vor Verdauung zu schützen. In den Hauptversuchen wurde frischer Preßsaft mit dem gleichen Volumen normalen, d. h. nicht konzentrierten Kochsaftes bei 22° gelagert und in der unten näher zu beschreibenden Weise bei Beginn des Versuches und nach gewissen Zwischenräumen die Menge des gerinnbaren Eiweißes quantitativ bestimmt. Es zeigte sich, daß nach 1 bis 3 Tagen noch kaum eine Verminderung der koagulierbaren Eiweißkörper festzustellen ist, wogegen nach 7 Tagen bereits eine sehr deutliche Abnahme und nach etwa 2 Wochen ein fast vollständiges Verschwinden der gerinnbaren Stoffe bemerkbar werden. Der Kochsaftzusatz verleiht somit zeitweiligen Schutz gegen die verdauende Wirkung der Endotryptase, keinen dauernden, weil nach den einschlägigen Versuchen (Tabelle IX) die Antiprotease des Kochsaftes selbst der Zerstörung durch Lipasen und wohl auch durch die Lipasen des Preßsaftes anheimfällt. Bei den Kontrollversuchen lagerte dagegen der Preßsaft nur mit 1 Vol. Wasser verdünnt. Hier war schon nach 1 bis 2 Tagen eine sehr deutliche Abnahme des gerinnbaren Eiweißes eingetreten und nach etwa 1 Woche ein beinahe vollständiges Verschwinden. In der letzten Spalte der Tabelle sind die Unterschiede in der Menge des Koagulates bei den Haupt- und den Kontrollversuchen zusammengestellt. Kleine Gewichtsdifferenzen finden sich schon beim Aufkochen der eben hergestellten Gemische einerseits von Preßsaft und Kochsaft, andrerseits von Preßsaft und Wasser. Da die Fällung bei Gegenwart von Kochsaft immer etwas größer ist, scheinen Bestandteile des Kochsaftes sich mit den koagulierenden Substanzen

[1]) Diese Zeitschr. 19, 211, 1909.

zu verbinden oder doch mit jenen niedergerissen zu werden. Die Unterschiede werden aber nach 1 bis 2tägigem Lagern erheblich größer und erreichen nach 2 bis 7 Tagen ein Maximum, worauf sie wieder abnehmen.

Tabelle I.

Kochsaftzusatz konserviert beim Lagern des Preßsaftes außer der Zymase auch das gerinnbare Eiweiß.

Nummer	Herkunft der Hefe	Dauer des Lagerns in Tagen	Gärkraftbestimmungen				Eiweißfällungen		
			Hauptversuche: 5 ccm Preßsaft + 5 ccm Kochsaft, nach dem Lagern versetzt mit 4g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol		Kontrollversuche: 5 ccm Preßsaft + 5 ccm Wasser, nach dem Lagern versetzt mit 4g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol		Hauptversuche: Gerinnbares Eiweiß in 20 ccm der Preßsaft-Kochsaft-mischung (enthaltend 10ccm Preßsaft)	Kontrollversuche: Gerinnbares Eiweiß in 20 ccm der Preßsaft-Wasser-mischung (enthaltend 10ccm Preßsaft)	Differenz zwischen den beiden Proben
			Weiterer Kochsaftzusatz nach dem Lagern ccm	CO_2 g	Weiterer Kochsaftzusatz nach dem Lagern ccm	CO_2 g	g	g	g
1	Berliner untergärige Hefe	0	0	0,27	0	0,16	0,43	0,39	0,04
			10	0,51	10	0,37			
2		2	0	0,10	0	0,00	0,43	0,17	0,26
			10	0,33	10	0,00			
3		7	0	0,00	—	—	0,16	0,02	0,14
			10	0,00	—	—			
4		12	—	—	—	—	0,04	0,00	0,04
			—	—	—	—			
5		0	0	0,41	0	0,26	0,66	0,60	0,06
			10	0,58	10	0,42			
6		1	0	0,31	0	0,00	0,66	0,37	0,29
			10	0,45	10	0,00			
7		3	0	0,10	0	0,00	0,60	0,14	0,46
			10	0,30	10	0,00			
8		7	—	—	—	—	0,48	0,01	0,47
			—	—	—	—			
9		14	—	—	—	—	0,04	0,00	0,04
			—	—	—	—			
10	Breslauer Unter-Hefe	0	0	0,83	0	0,35	0,95	0,95	0,00
			10	1,32	10	1,06			
11		1	0	0,76	0	0,00	0,99	0,72	0,27
			10	1,14	10	0,00			
12		7	—	—	—	—	0,74	0,06	0,68
			—	—	—	—			

Die Bestimmung des gerinnbaren Eiweißes erfolgte in der Weise, daß 20 ccm des Preßsaft-Kochsaft- bzw. Preßsaft-Wasser-Gemisches mit 80 ccm Wasser, 5 ccm gesättigter Kochsalzlösung

und 0,2 ccm Eisessig versetzt und hierauf auf dem Drahtnetz zum Sieden erhitzt wurden. Um die Fällung möglichst vollständig zu machen, wurde sodann noch 1 bis 2 Stunden im Wasserbade erhitzt und die über dem gefällten Eiweiß stehende, immer noch etwas trübe Flüssigkeit durch ein gewogenes Filter filtriert. Der Niederschlag, auf das Filter gebracht und mit Alkohol und Äther gewaschen, wird schließlich bei 105° getrocknet.

Die meisten in der Tabelle I enthaltenen Angaben sind Durchschnittswerte von 2 Parallelversuchen mit nahezu übereinstimmenden Zahlen.

Antiproteolytische Wirkung des Kochsaftes, nachgewiesen mittels Gelatine.

Nach dem eben Erörterten kann man von einer antiproteolytischen Wirkung des Kochsaftes sprechen, welche die beim Lagern des Hefepreßsaftes eintretenden Verdauungsvorgänge durch die Endotryptase verhindert oder wenigstens verzögert. Als sehr bequemes Reagens zur Prüfung auf eine solche Schutzwirkung empfahl sich Gelatine, wie sie von M. Hahn auch seinerzeit zum ersten Nachweis der Endotryptase benützt worden war. In der Tat zeigte sich bald, daß beim Überschichten von erstarrter, nach der Herstellung längere Zeit (meist 24 Stunden) gestandener Gelatine mit altem, durch Eindampfen zum Sirup konzentriertem, lange gelagertem Hefepreßsaft[1]) nach einigen Stunden eine Verschiebung der Berührungsstelle zwischen Flüssigkeit und Gelatine zu bemerken ist, infolge Verflüssigung der letzteren durch die Endotryptase des Preßsaftsirups. Wird die Gelatine statt mit Wasser mit Kochsaft hergestellt, so tritt keine derartige Erscheinung ein. Durch Zahlen wiederzugebende Resultate ließen sich in der Weise erzielen, daß die Gelatine in engen, graduierten Zylindern zum Erstarren gebracht und hierauf direkt die Endotryptaselösung aufgeschüttet wurde, der vorsichtshalber immer etwas Toluol zugesetzt worden war. Die Menge der verflüssigten Gelatine konnte dann nach gewissen Zeitabschnitten direkt an der Graduierung der Meßzylinder in Kubikzentimetern abgelesen werden.

[1]) Vgl. Buchner und F. Klatte, diese Zeitschr. 8, 528; 9, 420, 1908.

In Tabelle II sind 4 derartige Versuchsreihen zusammengestellt, von denen die ersten drei mit 4,5%iger Gelatine, die vierte mit 9%iger angestellt sind. Die Schutzwirkung des Kochsaftes trat überall sehr deutlich hervor, besonders in den beiden ersten Versuchsreihen bei Anwendung von konzentriertem, d. h. im Vakuum auf ein Viertel seines Volumens eingedampftem Kochsaft, in geringerem Umfange, aber immer noch unverkennbar, bei Anwendung von normalem, d. h. nicht eingedicktem Kochsaft (3. Versuchsreihe).

Ähnliche Versuche sind auch noch in Tab. IV enthalten.

Tabelle II.

Kochsaft schützt Gelatine vor der Verflüssigung durch die Endotryptase.

Je $1^1/_2$ ccm einer 9%igen Chloroformgelatine gemischt mit 1 Vol. Kochsaft bzw. Wasser (Kontrollversuche) und längere Zeit nach dem Erstarren überschichtet mit 1 ccm einer Endotryptaselösung[1]) (Versuche 1 bis 12) oder 3 ccm einer 9%igen Gelatine, direkt hergestellt mit Kochsaft bzw. Wasser und ebenso übergossen mit Endotryptaselösung[2]) (Nr. 13 bis 16). Antisepticum: Toluol. Temp. 22°.

Nummer	Datum	Chloroformgelatine		Verflüssigte Gelatine in Kubikzentimetern nach Tagen						
		Gehalt an Gelatine %	hergestellt und erstarrt mit	1	3	4	5	6	7	8
1	2. Dez.	4,5	Wasser	0,3	0,8	1,0	—	—	—	1,8
2	„	4,5		0,3	0,7	1,0	—	—	—	1,7
3	„	4,5	konz. Koch-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	„	4,5	saft	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	23. Febr.	4,5	Wasser	0,1	0,5	0,7	0,8	1,0	1,1	1,3
6	„	4,5		0,2	0,6	0,8	0,9	1,1	1,2	1,4
7	„	4,5	konz. Koch-	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
8	„	4,5	saft	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
9	15. Okt.	4,5	Wasser	0,4	1,6	—	—	—	—	—
10	„	4,5		0,4	2,2	—	—	—	—	—
11	„	4,5	normaler	0,3	0,8	—	—	—	—	—
12	„	4,5	Kochsaft	0,2	0,6	—	—	—	—	—
13	4. Nov.	9	Wasser	0,3	0,9	1,0	—	—	—	—
14	„	9		0,3	0,9	1,0	—	—	—	—
15	„	9	Kochsaft	0,0	0,1	0,1	—	—	—	—
16	„	9		0,0	0,1	0,1	—	—	—	—

[1]) 0,5 g Preßsaftsirup + 4 ccm Wasser.

[2]) 0,75 g Preßsaftsirup + 1 ccm Wasser.

Antiproteolytische Wirkung des Kochsaftes, nachgewiesen mittels Milch.

Nach Bierry und Henri[1]) kann man zum Nachweis von Verdauungsenzymen frische Milch benützen, deren weiße Farbe durch proteolytische Vorgänge aufgehellt wird. Versuche, ob die Verdauung des Caseins der Milch durch eine Tryptaselösung nach Zufügen von Kochsaft verzögert wird, haben zu einem bejahenden Ergebnis geführt. Die Erscheinungen sind vollkommen andere, wenn man einerseits zu mit Wasser verdünnter Milch Tryptaselösung und etwas Soda andererseits zu mit normalem Kochsaft verdünnter Milch die gleichen Zusätze hinzugibt. In ersterem Falle wird bei 38° die weiße Farbe bereits nach 3 Minuten durchscheinend; nach 8 Minuten ist die Flüssigkeit vollkommen aufgehellt und fast durchsichtig geworden. Im zweiten Falle tritt kurz nach der Mischung merkwürdigerweise Gerinnselbildung ein, so daß die Masse dickflüssig wird und nach 3 Minuten die Ausscheidung von festen Partikelchen direkt wahrzunehmen ist. Die Entstehung des Niederschlages ist besonders merkwürdig, da weder Kochsaft und Trypsinlösung, auch auf Zusatz von etwas Soda nicht, noch Milch und Kochsaft mit einer Spur Soda eine Fällung geben. Der Niederschlag bei 38° aufbewahrt, ist nach 8 Minuten noch nicht merklich in Abnahme begriffen, wohl aber nach 26 Minuten bis auf einige Flocken wieder aufgelöst. Die proteolytische Wirkung des Trypsinpräparates ist demnach durch den Kochsaftzusatz nur für einige Zeit hinausgezögert worden.

Um die zu den Versuchen verwendete Milch möglichst von Fett zu befreien, wurde sie vorher 10 Minuten lang bei etwa 3000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert und durch ein angefeuchtetes Papierfilter gegossen.

Die Resultate von zwei hierher gehörigen Versuchen, von denen noch eine größere Anzahl mit gleichem Ergebnis angestellt wurden, sind in Tabelle III wiedergegeben.

Einige Andeutungen über die Vorgänge, die beim Mischen von Milch und Kochsaft aus Hefe eintreten, gibt auch noch die Beobachtung, daß die durch Essigsäure erzeugte Fällung

---

[1]) Soc. Biol. 54, 667, 1902; zit. nach C. Oppenheimer, Die Fermente 2, 3. Aufl., 124, 1909.

aus einem Milch-Kochsaft-Gemisch größer ist als die aus einem entsprechenden Milch-Wasser-Gemisch, wogegen Kochsaft für sich mit Essigsäure überhaupt keine Fällung gibt. Das Gewicht der ersteren Fällung betrug z. B. in einem Versuche 1,13, in einem anderen 0,70 g, das der letzteren dagegen nur 0,73 g bzw. 0,59 g. Es müssen demnach durch Ansäuern fällbare Verbindungen zwischen Kochsaftbestandteilen und den Stoffen der Milch auftreten.

Tabelle III.

Kochsaft schützt das Casein der Milch während einiger Zeit vor der Verdauung durch Tryptase.

Nach Minuten	1. Versuch		2. Versuch	
	0,004 g Trypsinpräparat (Merck) gelöst in 1 ccm Wasser und zugefügt bei 38° zu		0,004 g Trypsinpräparat (Merck) gelöst in 1 ccm Wasser und zugefügt bei 38° zu	
	5 ccm Milch + 5 ccm Wasser + 1 Tr. Sodalösg.	5 ccm Milch + 5 ccm Kochsaft + 1 Tr. Sodalösg.	5 ccm Milch + 5 ccm Wasser + 1 Tr. Sodalösg.	5 ccm Milch + 5 ccm Kochsaft + 1 Tr. Sodalösg.
3	die weiße Farbe ist etwas durchscheinend geworden	infolge Gerinnselbildung in eine breiartige Masse verwandelt	Ergebnisse wie bei Versuch 1	
8	vollständig aufgehellt und fast durchsichtig	der Niederschlag ist noch kaum weniger geword.	Ergebnisse wie bei Versuch 1	
26	ebenso	der Niederschlag ist bis auf einige Flocken wieder gelöst	Ergebnisse wie bei Versuch 1	

Ist im Kochsaft ein Schutzstoff nur gegen Endotryptase oder allgemein antiproteolytischer Natur?

Zur näheren Charakterisierung des Schutzstoffes im Kochsaft, der das gerinnbare Eiweiß des Preßsaftes und die Gelatine vor der verdauenden Wirkung der Endotryptase bewahrt, war es von besonderem Interesse, ob der Kochsaft auch eine hemmende Wirkung gegenüber Pepsinase und Tryptase aufweist. Derartige Versuche ließen sich mit den Handelspräparaten dieser Enzyme leicht ausführen, indem auf Chloroformgelatine, hergestellt mit Wasser oder mit normalem bzw. konzentriertem Kochsaft, endotryptasehaltiger Preßsaft-Sirup oder eine Pepsinase-Salzsäure-Lösung oder eine Tryptase-Soda-Lösung

aufgeschichtet und die Verflüssigung der Gelatine bei einer Temperatur von 22° in schon oben beschriebener Weise festgestellt wurde. Vier derartige Versuchsreihen sind in Tab. IV wiedergegeben. Sie zeigen übereinstimmend, unabhängig von der Konzentration der Gelatine und von der Anwendung von konzentriertem bzw. normalem Kochsaft, daß alle drei Verdauungsenzyme durch die Stoffe des Kochsaftes gehemmt werden. Am stärksten ist allerdings der Schutz gegen die Endotryptase, am schwächsten, aber noch immer deutlich, der gegen Tryptase. Diese Ergebnisse legen den Gedanken nahe, daß die Schutzwirkung auf einer Vereinigung des Schutzstoffes mit der Gelatine beruhen wird, eine Frage, die weiter unten noch näher erörtert ist (s. Tabelle XVII).

Ko-Enzym und Antiprotease sind nicht identisch. Da im Kochsaft aus Hefe bereits ein Hilfsstoff der Enzymwirkung, das Ko-Enzym, nachgewiesen ist, war nach Entdeckung der Schutzwirkung des Kochsaftes für Zymase die Annahme am einfachsten, daß der Schutzstoff mit dem Ko-Enzym identisch sei.[1]) Diese Vermutung wird widerlegt durch eine Reihe von Versuchen, die zeigen, daß man durch längeres Sieden des Kochsaftes unter Rückfluß das Ko-Enzym vernichten kann, ohne doch die verdauunghemmende Wirkung zu zerstören (s. Tabelle V). Zunächst wurde immer die Fähigkeit des normal hergestellten Kochsaftes, ausgegorenen Preßsaft zu regenerieren, und die Unbrauchbarkeit desselben Kochsaftes nach mehrstündigem Kochen zu dem gleichen Zweck festgestellt (linke Hälfte der Tabelle). Hierauf wurde mit Wasser (Kontrollversuche) bzw. mit normalem, bzw. mit länger gekochtem Kochsaft hergestellte Gelatine mit Endotryptaselösung überschichtet, und der Umfang der Verflüssigung in gewissen Zeiträumen abgelesen (rechte Hälfte der Tabelle).

Die Ergebnisse sind alle eindeutig; obwohl nach 3 bis 4stündigem Kochen die Regenerationswirkung des Preßsaftes verschwunden oder auf ein Minimum zurückgegangen war, zeigte sich die antiproteolytische Wirkung noch sehr deutlich und nur wenig geschwächt gegenüber der des normal hergestellten Kochsaftes.

---

[1]) Buchner und Haehn, diese Zeitschr. 19, 196, 1909.

Tabelle IV.

Kochsaft schützt Gelatine vor Verflüssigung durch Endotryptase, Pepsinase und Tryptase.

Nummer	Datum	Chloroformgelatine: Gehalt an Gelatine %	Chloroformgelatine: hergestellt mit	Enzymlösung	Verflüssigte Gelatine in Kubikzentimetern nach Tagen: 1	2	3	4	5	8
1	22. Okt.	9	Wasser	0,25 g alter Preßsaftsirup in 1 ccm H_2O	0,4	—	0,7	1,0	1,2	1,6
2	„	9	norm. Kochsaft		0,2	—	0,2	0,4	0,5	0,7
3	„	9	Wasser	0,07 g Pepsin (Merck) in 1 ccm HCl (von 0,2%)	0,6	—	1,1	1,4	1,8	2,3
4	„	9	norm. Kochsaft		0,2	—	0,5	0,6	0,8	1,1
5	„	9	Wasser	0,02 g Trypsin (Merck) in 1 ccm H_2O + Spur Soda	0,9	—	1,8	2,4	—	—
6	„	9	norm. Kochsaft		0,5	—	1,0	1,3	—	—
7	1. Nov.	9	Wasser	0,75 g alter Preßsaftsirup in 1 ccm H_2O	0,3	0,6	0,9	—	—	—
8	„	9	konz. Kochsaft		0,0	0,0	0,1	—	—	—
9	„	9	Wasser	0,14 g Pepsin (Merck) in 1 ccm HCl (von 0,2%)	0,7	1,3	1,7	—	—	—
10	„	9	konz. Kochsaft		0,2	0,3	0,4	—	—	—
11	„	9	Wasser	0,04 g Trypsin (Merck) in 1 ccm H_2O + Spur Soda	0,7	1,3	1,9	—	—	—
12	„	9	konz. Kochsaft		0,3	0,7	0,9	—	—	—
13	4. Nov.	9	Wasser	0,75 g alter Preßsaftsirup in 1 ccm H_2O	0,1	0,5	0,9	1,0	—	—
14	„				0,2	0,5	0,9	1,0	—	—
15	„	9	Kochsaft		0,0	0,1	0,1	0,1	—	—
16	„				0,0	0,1	0,1	0,1	—	—
17	„	9	Wasser	0,14 g Pepsin (Merck) in 1 ccm HCl (von 0,2%)	0,4	0,7	1,0	1,2	—	—
18	„				0,4	0,7	1,0	1,2	—	—
19	„	9	Kochsaft		0,1	0,1	0,3	0,3	—	—
20	„				0,0	0,1	0,2	0,2	—	—
21	„	9	Wasser	0,04 g Trypsin (Merck) in 1 ccm H_2O + Spur Soda	0,6	1,2	1,7	2,1	—	—
22	„				0,6	1,2	1,9	2,3	—	—
23	„	9	Kochsaft		0,2	0,4	0,7	0,8	—	—
24	„				0,2	0,5	0,7	0,8	—	—
25	9. Nov.	4,5	Wasser	0,12 g alter Preßsaftsirup in 1 ccm H_2O	0,4	0,9	1,4	—	—	—
26	„	4,5	Kochsaft		0,0	0,0	0,2	—	—	—
27	„	4,5	Wasser	0,01 g Trypsin (Merck) in 1 ccm H_2O + Spur Soda	0,8	1,7	2,4	—	—	—
28	„	4,5	Kochsaft		0,5	1,0	1,5	—	—	—

Tabelle V.

Längeres Kochen vernichtet die regenerierende Wirkung des Kochsaftes, nicht aber die antiproteolytische für Gelatine.

Nummer	Datum	Regenerierungsversuche mit ausgegorenem Preßsaft.							Verflüssigung von Gelatine.				
		Gärkraftbestimmung: 20ccm frischer Preßsaft + 8 g Rohrzuck. + 0,2 ccm Toluol gaben Kohlendioxyd in g nach Tagen		Nach 3 Tagen: Zusatz von je 5 ccm konz. Kochsaft + 0,2 ccm Toluol	Regenerationswirkung: Kohlendioxyd in g nach Tagen				$1^1/_2$ ccm Chloroformgelatine von 9%, gemischt mit je 1 Volumen:	Durch 1 ccm Endotryptaselösung verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen			
		3	5		1	2	3	5		1	2	4	6
1	9. Juli	1,14	—	normal hergestellt	0,15	0,23	0,28	0,30	Wasser	—	0,8	1,3	1,8
2	14. Juli	1,58	—	4 St. gekocht	0,00	0,00	0,00	0,00	norm. konz. Kochsaft	—	0,0	0,0	0,0
3	„								4 St. gekochtem Kochsaft	—	0,0	0,1	0,4
4	2. Nov.[1]	—	0,84						Wasser	0,1	0,5	1,0	—
5	„	—	0,81							0,2	0,5	1,0	—
6	„	0,80	—	normal hergestellt	0,14	0,28	0,29	—	norm. konz. Kochsaft	0,0	0,1	0,1	—
7	„	0,81	—		0,15	0,28	0,30	—		0,0	0,1	0,1	—
8	10. Nov.	—	1,78										
9	„	—	1,79										
10	„	1,74	—	normal hergestellt	0,24	0,29	—	0,34	Wasser	0,4	0,7	—	1,8
11	„	1,70	—		0,25	0,34	—	0,39		0,6	0,8	—	1,9
12	„	1,78	—	3 St. gekocht	0,04	—	0,04	—	3 St. gekochtem Kochsaft	0,1	0,2	—	0,6
13	„	1,75	—		0,02	—	0,02	—		0,1	0,2	—	0,7
14	12. Nov.	1,74	—	normal hergestellt	—	—	0,24	0,34	norm. hergestelltem Kochsaft	0,0	—	0,0	0,0
15	„	1,70	—		—	—	0,25	0,39		0,0	—	0,0	0,0
16	„	1,76	—	4 St. gekocht	—	—	0,03	—	4 St. gekochtem Kochsaft	0,0	0,1	—	0,3
17	„	1,71	—		—	—	0,02	—		0,0	0,1	—	0,3

Eine Identität zwischen dem Ko-Enzym des Kochsaftes und dem Schutzstoff gegen proteolytische Vorgänge ist nach dem Resultat dieser Untersuchungen nicht vorhanden. Es erscheint daher zweckmäßig, dem Schutzstoff des Kochsaftes einen besonderen Namen beizulegen und ihn, da er gegen verdauende Wirkungen schützt, als Antiprotease zu bezeichnen.

Der Kochsaft besitzt die Fähigkeit, lagernden Preßsaft gärwirksam zu erhalten, eine Eigenschaft, die vermutlich auf

[1]) Die Versuche vom 2. Nov. wurden angestellt, um den normalen Kochsaft auf Ko-Enzym und Antiprotease zu prüfen. Die Versuche vom 10. Nov. zeigen dann, daß derselbe Kochsaft durch 3stündiges Kochen zwar das Ko-Enzym, aber nur einen kleinen Teil seiner Antiprotease eingebüßt hat.

Tabelle VI.

Längeres Kochen vernichtet die regenerierende Wirkung des Kochsaftes, nicht aber die konservierende auf lagernden Preßsaft.

Nummer	Datum	A. Prüfung des lange erhitzten Kochsaftes auf Ko-Enzym.									
		Gärkraftbestimmung: 20 ccm Preßsaft + 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol gaben Kohlendioxyd in g nach Tagen			Nach 3 Tagen Zusatz von 4 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol u. je 5 ccm	Regenerationswirkung: Kohlendioxyd in g nach Tagen				
		1	2	6		1	2	3	4	5
1	16. Febr.	0,60	1,28	1,35						
2	„	0,60	1,32	—	normalem Kochsaft	0,19	0,36	—	0,46	0,46
3	„	0,56	1,28	—		0,18	0,33	—	0,45	0,45
4	„	0,60	1,28	—	$5^1/_2$ St. gekochtem Kochsaft	0,03	0,05	—	0,05	—
5	„	0,58	1,28	—		0,02	0,03	—	0,03	—
6	22. Febr.	0,37	0,78	0,82						
7	„	0,37	0,80	0,84						
8	„	0,33	0,78	—	normalem Kochsaft	0,15	0,38	0,41	0,43	—
9	„	0,40	0,77	—		0,16	0,39	0,40	0,41	—
10	„	0,32	0,77	—	4 St. gekochtem Kochsaft	0,00	0,03			
11	„	0,32	0,77	—		0,02	0,04			

		B. Prüfung des lange erhitzten Kochsaftes auf Antiprotease.			Regenerationswirkung: Kohlendioxyd in g nach Tagen					
		20 ccm Preßsaft gelagert 24 Stunden unter Zusatz von	Selbstgärung in 24 St. CO_2 in g	Nach 24 Stunden Zusatz von	1	2	3	4	5	6
12	16. Febr.	Gärkraft: 20 ccm Preßsaft + 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol			0,50	—	1,15	1,18	—	—
13	„				0,51	—	1,11	1,16	—	—
14	„	ohne Zusatz	0,10	8 g Rohrzucker + 5 ccm konz. Kochs.	—	0,50	0,75	—	0,85	—
15	„		0,08		—	0,60	0,85	—	0,94	—
16	„	5 ccm norm. konz. Kochsaft	0,10	8 g Rohrzucker	—	1,05	1,47	—	1,58	—
17	„		0,10		—	0,98	1,40	—	1,50	—
18	„	5 ccm Kochsaft $5^1/_2$ St. gekocht	0,10	8 g Rohrzucker + 5 ccm konz. Kochs.	—	1,00	1,40	—	1,57	—
19	„		0,10		—	1,00	1,40	—	1,50	—
20	22. Febr.	Gärkraft: 20 ccm Preßsaft + 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol			0,42	—	1,01	1,07	1,09	1,10
21	„				0,49	—	1,05	1,10	1,13	1,13
22	„	ohne Zusatz	0,07	8 g Rohrzucker + 5 ccm konz. Kochs.	0,33	—	0,45	0,52	0,54	—
23	„		0,06		0,33	—	0,45	0,52	0,54	—
24	„	5 ccm norm. konz. Kochsaft	0,07	8 g Rohrzucker	0,68	—	0,98	1,20	1,29	1,30
25	„		0,06		0,68	—	0,98	1,20	1,29	1,30
26	„	5 ccm Kochsaft 4 St. lang gekocht	0,07	8 g Rohrzucker + 5 ccm konz. Kochs.	0,58	—	0,76	1,03	1,07	1,08
27	„		0,06		0,62	—	0,83	1,03	1,07	1,08

einen Schutz der Zymase vor der Endotryptase hinauslaufen und daher auch mit dem Ko-Enzym nichts zu tun haben konnte. Zur Prüfung dieses Gedankenganges wurde Hefepreßsaft mit 5 Stunden lang am Rückflußkühler gekochtem Kochsaft gelagert (Tabelle VI). Besondere Versuche (siehe die obere Hälfte der Tabelle) ergaben, daß derartig behandelter Kochsaft, wie zu erwarten war,[1]) seine Regenerationswirkung auf ausgegorenen Preßsaft eingebüßt hatte. Solcher lange gekochter Kochsaft zeigte aber (siehe die untere Hälfte der Tabelle) in der einen Versuchsreihe ganz unverminderte, in der anderen nur eine um weniges herabgedrückte Fähigkeit, Preßsaft bei eintägigem Lagern vor dem Verluste der Gärkraft zu bewahren. Diese Wirkung kommt demnach auch nicht dem Ko-Enzym, sondern der Antiprotease zu, die widerstandsfähiger gegen Siedehitze als ersterer Stoff ist und die Zymase vor der Verdauung durch die Endotryptase schützt.

Auch gegenüber Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure erwies sich die Antiprotease beständiger als das Ko-Enzym. Die einschlägigen Versuche (Tabelle VII) zerfallen wieder in solche, die die starke Abnahme der Regenerationswirkung durch Erhitzen des Kochsaftes mit Schwefelsäure beweisen (linke Hälfte der Tabelle) und in solche, die zeigen, daß dem, wie erwähnt, behandelten Kochsaft die Fähigkeit, Gelatine vor der Verflüssigung durch Endotryptase zu bewahren, noch innewohnt, wenn auch in geringerem Grade als dem normal hergestellten konzentrierten Kochsaft (rechte Hälfte der Tabelle).

Zur Prüfung der Regenerationswirkung wurde dabei nicht, wie sonst, ausgegorener Preßsaft verwendet, sondern mit Wasser mehrmals ausgewaschene Acetondauerhefe, d. h. durch Behandlung mit Aceton und Äther getötete Hefe. Dieses sehr einfache und zweckmäßige Verfahren ist von L. Iwanoff[2]) angegeben worden, der zeigte, daß man aus den unverletzten Zellen der Acetondauerhefe durch dreimaliges Behandeln mit kaltem Wasser in 5 Stunden sämtliches Ko-Enzym auswaschen kann. Wird dann durch ein gewöhnliches Filter filtriert, so bleiben als Rückstand die ausgewaschenen Zellen, die zwar noch zymasehaltig sind, aber Zuckerlösung erst auf Zusatz des Filtrates

[1]) Diese Zeitschr. 19, 216, 1909.

[2]) Centralbl. f. Bakt. 24, 1, 1909.

oder von Kochsaft, d. h. von Ko-Enzym, wieder vergären. Die ausgewaschenen Zellen der Acetondauerhefe, die Zuckerlösung für sich nicht vergären (Versuche 1, 2, 7, 8), können daher als bequemes Reagens auf den Ko-Enzym-Gehalt des normal hergestellten (Versuche 3, 4, 9 und 10) oder des mit Schwefelsäure erhitzten Kochsaftes (Versuche 5, 6, 11 und 12) verwendet werden.

Die Behandlung des Kochsaftes mit Schwefelsäure wurde in der Weise ausgeführt, daß in 20 ccm konzentrierten Kochsaft tropfenweise 2 g konzentrierte Schwefelsäure eingetragen und hierauf das Ganze 1 Stunde auf dem Wasserbade erwärmt wurde. Nach Neutralisation mit Natronlauge, die allerdings zu einer nicht unerheblichen Vermehrung des Volumens der Flüssigkeit führte, fand letztere Anwendung zu den Regenerations- und Verdauungsversuchen der Tabelle VII. Wenn auch eine totale Vernichtung der Regenerationswirkung in den beiden vorliegenden Versuchsreihen nicht erzielt wurde und ebensowenig eine vollständige Erhaltung der Antiprotease, so liegen doch die Ausschläge deutlich in der geschilderten Richtung. Einige hierher gehörige Versuche siehe auch Tabelle IX (Nr. 20 und 21).

Tabelle VII.

Erhitzen mit Schwefelsäure schädigt die regenerierende Wirkung des Kochsaftes stärker als die antiproteolytische.

Nummer	Datum	Je 2 g mit Wasser ausgewaschene Acetondauerhefe + 4 g Glucose + 0,2 ccm Toluol unter Zusatz von:	Gärkraftbestimmungen: CO_2 in g nach Tagen				$1^1/_2$ ccm 9%iger Chloroformgelatine gemischt mit je 1 Volumen	Verdauungsversuche: Durch 1 ccm einer Endotryptaselösung verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen			
			1	3	5	6		1	3	5	8
1	16. Febr.	10 ccm H_2O	0,01	0,01	—	—	Wasser	0,3	—	1,5	—
2	„		0,01	0,01	—	—		0,3	—	1,6	—
3	„	5 ccm H_2O + 5 ccm Kochsaft v. 8. Febr.	0,20	0,88	1,33	1,41	konz. Kochsaft v. 8. Febr.	0,0	0,0	0,0	—
4	„		0,22	0,90	1,30	1,40		0,0	0,0	0,0	—
5	„	10 ccm mit Schwefelsäure erhitztem Kochsaft	0,04	0,17	0,23	0,24	mit Schwefelsäure erhitztem Kochsaft	0,0	0,1	0,3	—
6	„		0,03	0,16	0,21	0,23		0,0	0,1	0,3	—
7	23. Febr.	10 ccm H_2O	0,00	0,00	—	—	Wasser	0,1	0,5	0,8	1,3
8	„		0,00	0,00	—	—		0,2	0,6	0,9	1,4
9	„	5 ccm H_2O + 5 ccm Kochsaft v. 22. Febr.	0,23	0,68	0,70		konz. Kochsaft v. 22. Febr.	0,0	0,0	0,1	0,2
10	„		0,23	0,69	0,69			0,0	0,0	0,1	0,2
11	„	10 ccm mit Schwefelsäure erhitztem Kochsaft	0,02	0,04	0,05		mit Schwefelsäure erhitztem Kochsaft	0,0	0,2	0,4	0,7
12	„		0,01	0,03	0,03			0,0	0,2	0,4	0,7

Versuche zur Trennung von Ko-Enzym und Antiprotease des Kochsaftes durch Fällungsmittel haben bisher zu keinem Ziele geführt. Z. B. wurde durch Eintragen von 25 ccm konzentriertem Kochsaft in 2 l absoluten Alkohol + 1 l Äther eine gelbliche, pulverige, sehr hygroskopische Fällung erhalten, die schnell abgesaugt und im Vakuum getrocknet 9,3 g wog. Wird dieser Niederschlag nun $^3/_4$ Stunden lang im Extraktionsapparat auf dem Wasserbade mit Methylalkohol ausgekocht, so hinterbleibt ein unlösliches, feinkörniges, hellbraunes Pulver (Präparat I), während beim Abdampfen der methylalkoholischen Lösung im Vakuum eine hellgelbe, dick-sirupförmige Masse erhalten wird (Präparat II). Präparat I ist dem Gewichte nach etwas weniger als Präparat II. Mit beiden Präparaten wurden nun Regenerierungs- und Gelatineverflüssigungsversuche, beide im Vergleiche mit demselben Kochsaft vor der Fällung und mit dem Verhalten der Gesamtfällung in der gewöhnlichen Weise angestellt (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Versuche zur Trennung von Ko-Enzym und Antiprotease.

Nummer	A. Regenerierungsversuche.						B. Gelatineverflüssigung.				
	Gärkraftbestimmung: 20 ccm Preßsaft + 8 g Rohrzucker + 0,2 ccm Toluol gaben Kohlendioxyd in g nach Tagen		Nach 3 Tagen Zusatz von 0,2 ccm Toluol und	Regenerationswirkung: Kohlendioxyd in g nach Tagen			$1^1/_2$ ccm Chloroformgelatine von 9% gemischt mit je 1 Volumen:	Durch 1 ccm einer Endotryptaselösung verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen			
	1	3		1	3	5		1	2	4	9
1	0,76	1,14	—	0,03	—	—	Wasser	0,3	0,5	1,0	1,9
2	0,76	1,11	—	0,01	—	—		0,3	0,5	1,0	1,9
3	0,75	1,10	5 ccm konz. Kochsaft v. 30. Nov.	0,22	0,43	0,48	konz. Kochsaft v. 30. Nov.	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,76	1,15		0,22	0,43	0,49		0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,70	1,13	1,96 g Kochsaftfällung[1]) + 5 ccm H_2O	0,21	0,38	0,39					
6	0,73	1,10		0,21	0,38	0,41					
7	0,73	1,10	0,83 g Präp. I[1]) + 5 ccm H_2O	0,18	0,36	0,36	einer Lösung von 0,83 g Präp. I in 5 ccm Wasser	0,0	0,0	0,0	0,2
8	0,76	1,12		0,18	0,33	0,35		0,0	0,0	0,0	0,2
9	0,83	1,13	1,12 g Präp. II[1]) + 5 ccm H_2O	0,03	0,06	—	einer Lösung von Präp. II in 5 ccm Wasser	0,2	0,4	0,9	1,7
10	0,78	1,11		0,05	0,07	—		0,3	0,5	0,9	1,8

Die Regenerierungsversuche (linke Hälfte der Tabelle) ergaben gute Regenerationswirkung, d. h. starken Ko-Enzym-Gehalt beim

[1]) Erhalten aus 5 ccm konz. Kochsaft.

ursprünglichen Kochsaft, bei der Gesamtfällung und bei Präparat I, während Präparat II sich nahezu wirkungslos erwies. Die Versuche über hemmende Wirkung auf die Verflüssigung von Gelatine durch Endotryptase (rechte Hälfte der Tabelle), haben zu ähnlichen Ergebnissen geführt; während der Kochsaft vor der Fällung eine starke Schutzwirkung ausübte, also viel Antiprotease enthielt, und auch Präparat I sehr deutlich im selben Sinne reagierte, war Präparat II so gut wie ohne Wirkung. D. h. also, man kann sowohl das Ko-Enzym wie die Antiprotease mittels Alkohol und Äther nahezu vollständig aus dem Kochsaft niederschlagen, und sowohl Ko-Enzym als Antiprotease finden sich bei Behandlung der Fällung mit kochendem Methylalkohol beinahe ohne Verlust im unlöslichen Rückstand, wogegen der Auszug höchstens Spuren davon enthält.

Einwirkung von Lipase und von Potasche auf Ko-Enzym und Antiprotease.

Um zu entscheiden, welcher Körpergruppe die Antiprotease beigezählt werden muß, schienen Versuche über das Verhalten des Kochsaftes gegenüber Ricinuslipase und gegenüber Potasche wünschenswert. Beide Stoffe schädigen nach früheren Ergebnissen das Ko-Enzym in hohem Grade.[1]) Indem wir 3 Tage mit Lipase bzw. mit Potasche behandelten Kochsaft (Tabelle IX) einerseits auf seine Regenerationswirkung, andererseits auf seine antiproteolytischen Eigenschaften prüften, ergab sich in Bestätigung der früheren Beobachtungen eine wesentliche Zerstörung des Ko-Enzyms durch beide Stoffe (bei Potasche allerdings nur bei der höheren Konzentration), wogegen eine Hemmung der Verdauungsvorgänge nur bei dem mit Potasche behandelten, nicht oder nur in geringstem Umfang aber bei dem mit Lipase gelagerten Kochsaft nachzuweisen war, d. h. also während die Antiprotease durch Lipase stark geschädigt wird, ist Potasche ohne Einfluß; es zeigt sich somit hier ein Unterschied zwischen Ko-Enzym und Antiprotease. Als letzte Versuche der Tabelle IX (Nr. 20 und 21) sind noch einige Experimente über die Wirkung von mit Schwefelsäure erhitztem Kochsaft angereiht, einerseits auf ausgegorenen Preß-

[1]) Diese Zeitschrift 19, 215, 217, 1909.

saft, andererseits auf Gelatineverflüssigung durch Endotryptase, ausgeführt mit demselben Hefepreßsaft und Kochsaft wie die Versuche Nr. 9 bis 19; sie schließen sich an die früher mitgeteilten Versuche der Tabelle VII an, bei denen die Regenerationswirkung aber nicht mit ausgegorenem Preßsaft, sondern mit ausgewaschener Acetondauerhefe geprüft wurde; in Übereinstimmung mit jenen Resultaten ergab sich auch jetzt wieder, daß das Ko-Enzym gegen die Behandlung mit Schwefelsäure sehr empfindlich ist, wogegen die Antiprotease größere Beständigkeit zeigt.

Was die Ausführung der Versuche mit Ricinuslipase-Emulsion betrifft, für deren Überlassung wir wieder den Vereinigten Chemischen Werken, A.-G., Charlottenburg, insbesondere Herrn Dr. E. Hoyer, zu danken haben, so wurden je 5 ccm konzentrierter Kochsaft mit 8 g sauer reagierendem Lipasebrei unter Zusatz von Toluol 3 Tage bei 37° gelagert und hierauf zur Zerstörung der Lipase 2 Minuten lang zum Sieden erhitzt. Zur Verwendung kam dann der so erhaltene Brei oder das Filtrat von demselben (Nr. 5, 6 und 13, 14). Zur Kontrolle wurden auch Versuche mit Kochsaft angestellt, der nur der Einwirkung von vorher $^1/_4$ Stunde lang aufgekochtem und daher sehr geschwächtem Lipasebrei ausgesetzt war (Nr. 7, 8, 15).

Bei den Versuchen mit Potasche wurde konzentrierter Kochsaft mit 0,5 bzw. 0,25 g der Substanz und unter Zusatz von Toluol 3 Tage lang bei 37° gelagert und hierauf mit Phosphorsäure neutralisiert (Nr. 16 bis 19).

Bei den Versuchen über Erhitzen des Kochsaftes mit Schwefelsäure wurden 15 ccm konzentrierter Kochsaft mit je 1,5 g konzentrierter Schwefelsäure tropfenweise versetzt und hierauf das Ganze 1 Stunde lang auf dem Wasserbade erhitzt. Sodann erfolgte Neutralisation durch Natronlauge, wobei das Volumen auf 30 ccm anstieg. Für jeden Regenerierungsversuch kamen 10 ccm dieser Lösung entsprechend 5 ccm konzentriertem Kochsaft zur Anwendung. Bei den Gelatineverflüssigungs-Versuchen konnten, um die Konzentration der Chloroform-Gelatine nicht zu ändern, nur je 1,5 ccm zugesetzt werden. Daß bei diesen beiden Versuchen kein vollständigerer Schutz der Gelatine erreicht wurde, mag mit dem sehr geringen Zusatz an Kochsaft zusammenhängen (Nr. 20 und 21).

Tabelle IX.

Verhalten von Ko-Enzym und Antiprotease gegen Ricinuslipase und Potasche.

Nummer	Datum	A. Regenerierungsversuche: Gärkraftbestimmung: 20 ccm Preßsaft + 8 g Rohrz. + 0,2 ccm Toluol gaben Kohlendioxyd in g nach Tagen		Zum ausgegorenen Preßsaft n. 3 Tagen Zusatz von je 5 ccm Kochsaft + 4 g Rohrz. + 0,2 ccm Tol.	Regenerationswirkung: Kohlendioxyd in g nach Tagen				B. Gelatineverflüssigung: $1^1/_2$ ccm Chloroform-Gelatine von 9% gemischt mit je 1 Vol.	Durch 1 ccm Endotryptaselösung verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen			
		1	3		1	2	3	4		1	2	3	4
1	2. Dez.	0,76	1,14	ohne Zusatz	0,03	—	—	—	Wasser	0,3	0,5	0,8	1,0
2	„	0,76	1,11		0,01	—	—	—		0,3	0,5	0,7	1,0
3	„	0,75	1,10	konz. Kochsaft	0,22	0,35	0,43	0,48	konz. Kochsaft	0,0	0,0	0,0	0,0
4	„	0,76	1,15		0,22	0,35	0,48	0,49		0,0	0,0	0,0	0,0
5	„	0,73	1,08	Lipase-Kochsaft-Gemenge	0,00	0,01	0,01	—	Lipase-Kochsaft-Gemenge	0,2	0,4	0,7	0,9
6	„	0,72	1,08		0,01	0,01	0,01	—		0,2	0,5	0,7	0,9
7	„	0,71	1,06	Kochsaft, mit gekochter Lipase behandelt	0,16	0,25	0,28	0,29					
8	„	0,72	1,09		0,17	0,24	0,28	0,28					
9	13. Dez.	0,63	1,06	ohne Zusatz	0,02	0,04	0,04	—	Wasser	0,3	0,5	0,7	1,0
10	„	—	—		—	—	—	—		0,2	0,4	0,7	1,0
11	„	0,60	1,07	konz. Kochsaft	0,22	0,35	0,39	0,42	konz. Kochsaft	0,1	0,1	0,2	0,3
12	„	0,57	1,02		0,21	0,33	0,39	0,41		0,0	0,1	0,2	0,3
13	„	0,51	1,05	Lipase-Kochsaft-Gemenge	0,02	0,03	0,03	—	Lipase-Kochsaft-Gemenge	0,2	0,3	0,5	0,7
14	„	0,56	1,07		0,01	0,02	0,02	—		0,2	0,4	0,6	0,8
15	„	0,63	1,06	Kochsaft, mit gekochter Lipase behandelt	0,21	0,30	0,34	—					
16	„	0,60	1,03	Potasche-Kochsaft ($0{,}5$ g K_2CO_3)	0,05	0,07	0,09	0,09	Potasche-Kochsaft ($0{,}5$ g K_2CO_3)	0,0	0,1	0,1	0,2
17	„	0,62	1,05		0,04	0,05	0,08	0,08		0,0	0,1	0,1	0,1
18	„	0,53	1,03	Potasche-Kochsaft ($0{,}25$ g K_2CO_3)	0,20	0,30	0,33	0,35	Potasche-Kochsaft ($0{,}25$ g K_2CO_3)	0,0	0,0	0,0	0,1
19	„	0,54	1,04		0,15	0,25	0,28	0,31		—	—	—	—
20	„	0,57	1,05	mit Schwefelsäure erhitzt. Kochsaft	0,02	0,05	0,05	0,05	mit Schwefelsäure erhitzt. Kochsaft	0,0	0,1	0,2	0,3
21	„	0,55	1,04		0,04	0,05	0,06	0,06		0,0	0,1	0,2	0,3

Einfluß der Reaktion der Lösung.

Manche Enzymwirkungen werden von der Reaktion der umgebenden Flüssigkeit außerordentlich beeinflußt. Speziell die Endotryptasewirkung auf gerinnbares Eiweiß wird nach den

Versuchen von M. Hahn[1]) durch schwach saure Reaktion sehr gefördert, dagegen durch größeren Säurezusatz verlangsamt. Ebenso verzögert Alkali, ja selbst schon Neutralisation des gewöhnlich schwach sauren Hefepreßsaftes deutlich. Um über die Existenz der Antiprotease im Kochsaft urteilen zu können, mußte deshalb der Einfluß der Reaktion der Flüssigkeiten auf die in Frage kommenden Enzymwirkungen untersucht werden, besonders nachdem sich gezeigt hatte, daß schon verhältnismäßig geringe Zusätze von Essigsäure die Verflüssigung der Gelatine durch Endotryptase sehr deutlich hemmen (Tab. X).

Tabelle X.

Starker Säurezusatz verhindert die Verflüssigung der Gelatine durch die Endotryptase.

Nummer	Datum	1½ ccm Chloroformgelatine von 9% gemischt mit je 1 Volumen	Zusatz von 10%iger Essigsäure	Durch Endotryptaselösung verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen					
				1	2	3	4	5	6
1	9. Sept.	Wasser	—	0,3	0,5	0,7	0,8	—	1,1
2	„		—	0,3	0,5	0,7	0,8	—	1,1
3	„	konz. Kochsaft	bis zur sauren Reaktion	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	13. Dez.	Wasser	—	0,3	0,5	0,7	1,0	—	—
5	„		—	0,3	0,5	0,7	1,0	—	—
6	„	konz. Kochsaft	0,2 ccm	0,0	0,0	0,1	0,2	—	—
7	„			0,0	0,0	0,1	0,2	—	—
8	23. Feb.	Wasser	—	0,2	—	0,6	0,7	0,9	1,0
9	„		—	0,2	—	0,6	0,8	0,9	1,1
10	„		0,2 ccm	0,0	—	0,1	0,2	0,2	0,2
11	11. März	Wasser	—	—	0,4	0,6	0,8		
12	„		—	—	0,4	0,6	0,8		
13	„		0,2 ccm	—	0,1	0,2	0,2		
14	„			—	0,1	0,2	0,2		

Da der Kochsaft sowohl wie die Chloroformgelatine stets schwach saure Reaktion zeigen, wäre es denkbar gewesen, daß die Verzögerung der Endotryptasewirkungen nur darauf zurückgeführt werden mußte. Die Versuche haben aber in anderem Sinne

[1]) M. Hahn und L. Geret, Zeitschr. f. Biol. 40, 117. — E. und H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung, München 1893, S. 318.

entschieden: trotz Neutralisation und selbst bei schwach alkalischer Reaktion des Gelatinegemisches zeigt sich die hemmende Wirkung des Kochsaftes auf Verflüssigung von Gelatine sehr deutlich (Tabelle XI).

Tabelle XI.

Auch neutralisierter Kochsaft hemmt die Verflüssigung von Gelatine.

Nummer	Datum	$1^1/_2$ ccm Chloroformgelatine von 9% gemischt mit je 1 Volumen	Reaktion des Gelatinegemisches	Durch Endotryptaselösung[1]) verflüssigte Gelatine in ccm n. Tag.			
				1	2	3	4
1	28. Febr.	Wasser	ganz schwach sauer	0,2	0,4	0,6	0,8
2	„			0,2	0,4	0,6	0,9
3	„	konz. Kochsaft[2])	deutlich sauer	0,0	0,0	0,0	0,0
4	„			0,0	0,0	0,0	0,0
5	„	konz. Kochsaft neutralisiert mit NaOH	neutral	0,0	0,0	0,0	0,1
6	„			0,0	0,0	0,0	0,1
7	„	konz. Kochsaft, durch NaOH ganz schwach alkalisch	ganz schwach alkalisch	0,0	0,0	0,1	0,1
8	11. März	Wasser	ganz schwach sauer	—	0,4	0,6	0,8
9	„			—	0,4	0,6	0,8
10	„	konz. Kochsaft	deutlich sauer	—	0,0	0,0	0,0
11	„			—	0,0	0,0	0,0
12	„	konz. Kochsaft neutralisiert	neutral	—	0,0	0,0	0,0
13	„			—	0,0	0,0	0,0

Kann die antiproteolytische Wirkung des Kochsaftes schon durch die Anwesenheit von Aminosäuren erklärt werden?

Nach E. Abderhalden und Gigon[3]) wirken Aminosäuren bei der Hydrolyse von Polypeptiden durch alten, gärunwirksamen Hefepreßsaft verzögernd; so wird z. B. der Ab-

[1]) Es kamen zwei verschiedene Preßsaftsirupe zur Verwendung, für Nr. 1 bis 7 ein Präparat vom 24. Jan. 06, für Nr. 8 bis 18 vom 17. Juli 06; die durch Verdünnen hergestellte Endotryptaselösung reagierte stets sauer.

[2]) Kochsaft reagiert schwach sauer.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 275.

bau von Glycyl-Tyrosin durch Zusatz von Alanin und Leucin stark gehemmt.

Ausführliche Versuche haben nun ergeben, daß die Verflüssigung von Gelatine durch Endotryptaselösung bei Zusätzen von Tyrosin, Leucin und Asparaginsäure[1]) nicht deutlich beeinflußt und daß die lösende Wirkung von Pepsinase durch die gleichen Zusätze, insbesondere aber durch Pepton beschleunigt wird (Tabelle XII). Ferner wirken Tyrosin, Alanin und Leucin auf lagernden Preßsaft nicht konservierend ein, wie dies Kochsaft tut (Tabelle XIII). Alle diese Versuche machen es, wenn die Frage auch noch keineswegs als endgültig gelöst betrachtet werden kann, nicht wahrscheinlich, daß Eiweißabbauprodukte das antiproteolytische Agens des Kochsaftes darstellen.

Tabelle XII.

Aminosäuren hemmen die Verflüssigung der Gelatine durch Endotryptase nicht.

Nummer	3 ccm Chloroformgelatine von 9% mit Zusatz von	Enzymlösung	Verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen		
			1	2	3
1	ohne Zusatz	Endotryptaselösung (0,75 g Preßsaftsirup vom 24. Jan. 06 + 1 ccm Wasser)	0,3	0,6	0,9
2	0,15 g Tyrosin		0,3	0,6	0,8
3	0,16 g Leucin		0,3	0,8	1,1
4	0,15 g Asparaginsäure		0,1	0,5	0,6
5	3 ccm Wasser	0,05 g Pepsin-Präparat + 1 ccm Salzsäure von 2%	0,7	1,2	1,7
6			0,7	1,2	1,7
7	3 ccm konz. Kochsaft		0,2	0,4	0,7
8			0,2	0,4	0,6
9	3 ccm Wasser		3,1	—	—
10	+ 0,2 g Pepton		3,0	—	—
11	3 ccm Wasser		0,9	1,5	2,0
12	+ 0,1 g l-Tyrosin		0,8	1,3	1,8
13	3 ccm Wasser		0,6	1,1	2,9
14	+ 0,1 g Leucin		0,5	1,0	3,0
15	3 ccm Wasser		2,8	—	—
16	+ 0,2 g l-Asparaginsäure		2,9	—	—

[1]) Bei den angewandten Konzentrationen waren Asparaginsäure und Leucin größtenteils, Tyrosin nur teilweise in Lösung.

Tabelle XIII.

Zusatz von Aminosäuren konserviert die Zymase im lagernden Preßsaft nicht.

Nummer	Datum	20 ccm Preßsaft lagert 24 Stunden unter Zusatz von	Selbstgärung in 24 St.	Nach 24 Stunden Zusatz von	Regenerationswirkung Kohlendioxyd in g nach Tagen				
					1	3	4	5	6
1	22. Feb.	ohne Zusatz	0,07	8 g Rohrzuck. + 5 ccm konz. Kochsaft	0,33	0,45	0,52	0,54	—
2	„		0,06		0,33	0,45	0,52	0,54	—
3	„	5 ccm konz. Kochsaft	0,07	8 g Rohrzucker	0,68	0,98	1,20	1,29	1,30
4	„		0,07		0,68	0,98	1,20	1,29	1,30
5	„	5 ccm Wasser + 0,1 g l-Tyrosin (z. T. ungelöst)	0,05	8 g Rohrzuck. + 5 ccm konz. Kochsaft	0,20	0,23	0,24	—	—
6	„		0,05		0,20	0,23	0,24	—	—
7	„	5 ccm Wasser + 0,4 g i-Alanin (löst sich auf)	0,05	8 g Rohrzuck. + 5 ccm konz. Kochsaft	0,34	0,47	0,57	0,60	—
8	„		0,05		0,35	0,50	0,58	0,59	—
9	„	5 ccm Wasser + 0,3 g i-Leucin (z. T. gelöst)	0,05	8 g Rohrzuck. + 5 ccm konz. Kochsaft	0,40	0,54	0,60	0,62	0,62
10	„		0,05		0,38	0,48	0,53	0,54	0,54

Zerstörung der Antiprotease durch überhitzten Wasserdampf.

Der Kochsaft, welcher seine antiproteolytische Wirkung auch bei mehrstündigem Kochen mit Wasser behält, verliert dieselbe

Tabelle XIV.

Erhitzen unter Druck zerstört die Antiprotease des Kochsaftes.

Nummer	Datum	$1^1/_2$ ccm Chloroformgelatine von 9%, gemischt mit je 1 Vol.	Endotryptaselösung	Temp.	Verdaute Gelatine in ccm nach Tagen			
					1	2	3	5
1	21. Juli	Wasser	1 ccm von 0,5 g Preßsaftsirup vom 24. Jan. 06 in 4 ccm H_2O	22°	3,0	—	—	—
2	„	konz. Kochsaft		„	0,0	0,0	0,5	—
3	„	unt. Druck erhitzt. konz. Kochsaft		„	2,0	3,0	—	—
4	„			„	2,0	3,0	—	—
5	3. Aug.	Wasser	desgleichen	„	0,4	0,6	0,9	1,3
6	„			„	0,3	0,5	0,8	1,2
7	„	norm. konz. Kochsaft		„	0,0	0,0	0,0	0,0
8	„			„	0,0	0,0	0,0	0,0
9	„	gewöhnlichem Kochsaft		„	0,0	0,0	0,0	0,0
10	„			„	0,0	0,0	0,0	0,0
11	„	unt. Druck erhitzt konz. Kochsaft		„	0,1	0,4	0,7	1,1
12	„			„	0,1	0,4	0,7	1,1

beim Erhitzen unter Druck. In 2 Versuchen wurde konzentrierter Kochsaft im Autoklaven 3 Stunden auf 150 bis 165° erhitzt. Die rotbraune Flüssigkeit, vom Bodensatz abfiltriert und, da sie schwach sauer war, neutralisiert, hatte ihre Schutzwirkung für Gelatine gegenüber Verdauungsvorgängen, hervorgerufen durch Endotryptase, verloren (Tabelle XIV).

Antiprotease ist auch in der lebenden Hefe vorhanden.

Die Möglichkeit, daß der Schutzstoff gegen proteolytische Enzyme erst bei der Herstellung des Kochsaftes, also bei der Behandlung der Hefe mit kochendem Wasser entsteht, ließ sich durch den Nachweis von Antiprotease in der Acetondauerhefe ausschließen. Übergießt man letztere, die also durch Eintragen von frischer Hefe in Aceton bei gewöhnlicher Temperatur und Waschen mit Äther erzeugt wird und daher die Inhaltsstoffe der Hefezelle aller Wahrscheinlichkeit nach in nahezu unverändertem Zustande enthält, 3 mal auf einem Filter, mit etwa der 30fachen Menge kaltem Wasser, das in 3 Portionen aufgetragen wird, eine Operation, die etwa 5 Stunden in Anspruch nimmt,[1]) und konzentriert hierauf den Auszug im Vakuum auf 15 ccm, so resultiert eine Lösung, welche die Verflüssigung von Gelatine durch Endotryptase deutlich verzögert (Tabelle XV). Es muß bemerkt werden, daß dieser Versuch nicht immer mit dem gleichen Ergebnis endet, weil nachweislich (s. Tabelle XVI) auch Endotryptase aus der Dauerhefe in Lösung geht, deren Einfluß je nach der Qualität der Acetondauerhefe die Wirkung der Antiprotease verdecken kann.

Tabelle XV.

Der wässerige Auszug aus Acetondauerhefe enthält auch Antiprotease.

Nummer	Datum	$1^1/_2$ ccm Chloroformgelatine von 9%, gemischt mit je 1 Vol.	Durch 1 ccm Endotryptaselösung verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen					
			1	2	3	4	5	6
1	7. Febr.	Wasser	0,2	0,5	0,7	1,0	1,2	1,4
2	„		0,2	0,4	0,7	1,0	1,2	1,4
3	„	konz. wässerigem Dauerhefeauszug	0,1	0,2	0,3	0,5	0,6	0,7
4	„		0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,7

[1]) Vgl. die Angaben des Entdeckers dieses Verfahrens: L. Iwanoff, Centralbl. f. Bakt. 24, 1, 1909.

Tabelle XVI.

Der wässerige Auszug aus Acetondauerhefe enthält auch Endotryptase.

Nummer	Datum	1½ ccm Chloroformgelatine von 9%, gemischt mit je 1 Vol.	Enzymlösung	Verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen	
				10	18
1	11. März	Wasser	3 ccm wässerigen Acetondauerhefeauszug (nicht konz.)	0,5	0,9
2	„			0,5	0,9

Auf welchem Wege schützt die Antiprotease die Gelatine vor Verflüssigung?

Über diese interessante Frage liegen bisher nur wenige Versuche vor. Überschichtet man Gelatine mit einer Mischung von Endotrypstaselösung und Kochsaft, so tritt nach kurzer Zeit Verflüssigung der Gelatine von der Berührungsschicht aus ein, die aber nach etwa 2 Tagen ein vorzeitiges Ende nimmt. Es scheint dies anzudeuten, daß die Schutzwirkung der Antiprotease nicht auf einer Verbindung des letzteren Stoffes mit der Endotryptase beruht, denn zu einer solchen wäre vom ersten Augenblick an Gelegenheit gegeben, insbesondere wenn sie nach Art einer Neutralisation verliefe. Daß die regelrecht einsetzende Verflüssigung der Gelatine später unterbunden wird, läßt eher eine allmähliche Verbindung zwischen Antiprotease und Gelatine vermuten, auf die dann die Endotryptase wirkungslos bleibt.

Auch einige andere Versuche machen es nicht wahrscheinlich, daß die verzögernde Wirkung der Antiprotease auf eine Bindung der letzteren mit der Endotryptase zurückzuführen ist.[1]) Schichtet man eine Endotryptaselösung 1 bis 2 Wochen lang auf Kochsaft-Gelatine (zu 9%iger Chloroformgelatine, durch Erwärmen verflüssigt, wurde 1 Volumen konzentrierter Kochsaft gesetzt und nach dem Durchmischen das Ganze wieder erstarren gelassen), so ist während dieser langen Zeit reichlich Gelegenheit zur Festlegung der Endotryptase durch Bindung an die Antiprotease des Kochsaftes vorhanden. Zudem wurden durch

[1]) Versuche über Absorption der Endotryptase durch Blutfibrinflocken s. Buchner und R. Hoffmann, diese Zeitschr. 4, 217, 1907.

tägliches Schütteln der Röhrchen stets neue Schichten der Endotryptaselösung mit der Gelatine in Berührung gebracht. Die schließlich abgegossene Endotryptaselösung zeigte aber auf Gelatine noch das ursprüngliche Verflüssigungsvermögen (Tab. XVII). Im Gegenteil, es trat sogar eine kleine Verstärkung desselben ein (vgl. die Versuche 3 und 4 einerseits und die Kontrollversuche 5 und 6 andrerseits), was wahrscheinlich dadurch zu erklären ist, daß die Endotryptaselösung bei langem Aufschichten auf Gelatine durch Wasserabgabe an diese nachweislich an Volumen etwas einbüßt, womit eine Erhöhung ihrer Konzentration zusammenfällt.

Tabelle XVII.

Eine Bindung der Endotryptase an Gelatine oder Antiprotease ist nicht nachweisbar.

Nummer	Datum	$1^1/_2$ ccm Chloroformgelatine von 9 %, gemischt mit je 1 Vol.	1 ccm Endotryptaselösung (0,5 g Preßsaftsirup + 4 ccm H_2O)	Verflüssigte Gelatine in ccm nach Tagen					
				1	2	3	5	6	7
1	26. Juli	Wasser	hatte 10 Tage über Kochsaftgelatine gestanden	0,4	0,7	—	—	0,8	1,2
2	„		„ 8 „ „ „	0,4	0,7	—	—	1,2	—
3	2. Sept.	Wasser	hatte 7 Tage über Kochsaftgelatine gestanden	0,2	0,4	—	—	1,0	1,2
4	„			0,2	0,4	—	—	1,0	1,2
5	„		hatte 7 Tage für sich bei 22° gestanden (Kontrollvers.)	0,1	0,3	—	—	0,8	1,0
6	„			0,1	0,3	—	—	0,8	1,0
7	5. Jan.	Wasser	hatte 14 Tage über Kochsaftgelatine gestanden	0,5	1,1	2,0	2,3	—	—
8	„			0,5	1,1	1,6	2,3	—	—

Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittlung der daraus abspaltbaren Aldehydmenge.

Von

O. v. Fürth und D. Charnass, Wien.

(Eingegangen am 18. April 1910.)

Mit 2 Figuren im Text.

Eine quantitative Bestimmung der Milchsäure durch jodometrische Ermittlung der daraus auf oxydativem Wege abspaltbaren Milchsäure ist erst von Boas[1]), sodann von Jerusalem[2]) versucht worden. Wie von dem einen[3]) von uns kürzlich mitgeteilt worden ist, hat sich aus der Erkenntnis schwerwiegender Fehler, die bei der letztgenannten Untersuchung unterlaufen waren, die Notwendigkeit ergebon, sowohl die Bedingungen der Aldehydabspaltung aus Milchsäure, als auch der titrimetrischen Aldehydbestimmung einer gründlichen experimentellen Revision zu unterziehen, und sei es uns nunmehr gestattet, die Ergebnisse derselben mitzuteilen.

Wie wir vorausschickend bemerken möchten, hat es sich gezeigt, daß die Aldehydabspaltung aus Milchsäure unter ge-

---

[1]) Boas, Eine neue Methode der qualitativen und quantitativen Milchsäurebestimmung im Mageninhalt. Deutsche med. Wochenschr. **19**, 940, 1893.

[2]) E. Jerusalem, Über ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure in Organen und tierischen Flüssigkeiten (ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors O. v. Fürth im physiologischen Institut der Wiener Universität), I. und II. Diese Zeitschr. **12**, 361 und 379, 1908.

[3]) O. v. Fürth, Berichtigung, betreffend die Mitteilung von Ernst Jerusalem, „Über ein neues Verfahren usw.". Diese Zeitschr. **24**, 266, 1910.

wissen Bedingungen, wenn auch nicht geradezu quantitativ, doch immerhin so gleichmäßig verläuft, daß ein quantitatives Verfahren der Milchsäurebestimmung recht wohl auf diesem Prinzip basiert werden kann. Auch ließ sich der Vorgang so weit vereinfachen, daß derselbe ohne einen komplizierten Apparat und besondere Übung zu erfordern, eine Durchführung der Analyse in relativ kurzer Zeit gestattet.

I. Quantitative Aldehydbestimmung nach der Jodoformmethode durch Titration nach Messinger.

Wir begannen unsere Untersuchung damit, das Verfahren der Aldehydbestimmung zu überprüfen, und zwar wandten wir unsere Aufmerksamkeit zunächst dem von Boas empfohlenen und von Jerusalem übernommenen Verfahren der jodometrischen Aldehydbestimmung nach Messinger zu.

Dasselbe beruht auf der Voraussetzung, daß der Aldehyd sich mit alkalischer Jodlösung ganz analog dem Aceton unter Jodoformbildung nach der Liebenschen Formel umsetze, also:

$$CH_3COH + 3J_2 + 4NaOH = CHJ_3 + H \cdot COONa + 3NaJ + 3H_2O.$$

Säuert man sodann an und titriert das in Freiheit gesetzte Jod, so ergibt sich, jedem Moleküle Aldehyd entsprechend, ein Manko, und zwar nicht wie Jerusalem gemeint hat, von 3 J, sondern von 6 J. Denn nicht nur die zur Jodoformbildung verbrauchte Jodmenge entgeht der nachfolgenden Titration, sondern außerdem eine äquivalente Menge Jodkali.

1 ccm verbrauchter $^n/_{10}$-Jodlösung entspricht sonach $^1/_6$ ccm $^n/_{10}$-Aldehydlösung, und, da das Molekulargewicht des Aldehyds 44 beträgt, $\frac{0{,}0044}{6} = 0{,}000733$ g Aldehyd. (Vgl. Huppert, Analyse des Harnes, 10. Aufl., S. 761.)

Wir legten uns nunmehr die Frage vor, ob sich denn der Reaktionsverlauf tatsächlich unter allen Umständen im Sinne obiger Gleichung gestaltet, sobald Aldehyd mit einem Jodüberschusse in alkalischer Lösung zusammengebracht wird, oder ob ein quantitativer Ablauf der Reaktion etwa an bestimmte Bedingungen geknüpft sei.

1.

Zur Prüfung dieser Frage wurde zunächst von käuflichem reinstem Aldehyd (Kahlbaum, Bezeichnung „Siedepunkt 21°") ein Quantum im

verschlossenen Wägeglase genau gewogen, auf 1% verdünnt und die Titration in aliquoten Teilen genau nach den Vorschriften der Messinger-schen Acetonbestimmung vorgenommen.

0,05 g Aldehyd verbrauchten 27,1 ccm $^n/_{10}$-Jod = 39,8% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,05 g Aldehyd verbrauchten 23,5 ccm $^n/_{10}$-Jod = 34,5% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,05 g Aldehyd verbrauchten 27,9 ccm $^n/_{10}$-Jod = 40,9% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,05 g Aldehyd verbrauchten 25,4 ccm $^n/_{10}$-Jod = 37,2% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,05 g Aldehyd verbrauchten 28,0 ccm $^n/_{10}$-Jod = 41,1% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,05 g Aldehyd verbrauchten 22,0 ccm $^n/_{10}$-Jod = 32,5% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,10 g Aldehyd verbrauchten 62,5 ccm $^n/_{10}$-Jod = 45 8% der theoretisch geforderten Menge (= 136,4 ccm $^n/_{10}$-Jod).

Die Versuchsreihe wurde nunmehr mit der Abweichung wiederholt, daß die Aldehydlösung vor der Titration durch Zusatz von 800 ccm Wasser stark verdünnt wurde:

0,05 g Aldehyd verbrauchten 51,0 ccm $^n/_{10}$-Jod = 74,8% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,05 g Aldehyd verbrauchten 49,0 ccm $^n/_{10}$-Jod = 71,9% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,05 g Aldehyd verbrauchten 54,5 ccm $^n/_{10}$-Jod = 79,9% der theoretisch geforderten Menge (= 68,2 ccm $^n/_{10}$-Jod).

0,01 g Aldehyd verbrauchten 10,9 ccm $^n/_{10}$-Jod = 79,9% der theoretisch geforderten Menge (= 13,6 ccm $^n/_{10}$-Jod).

Dieser Versuch zeigt, daß die Titration des Aldehyds im höchsten Maße vom Verdünnungsgrade beeinflußt wird und daß sich in der unverdünnten Lösung weniger als die Hälfte der vorhandenen Aldehydmenge tatsächlich im Sinne der theoretischen Reaktionsgleichung umgesetzt hatte.

2.

Um die bei Wägung und Lösung des sehr flüchtigen Aldehyds unvermeidlichen Verluste einzuschränken, wurde bei einem weiteren Versuche reinster käuflicher Aldehyd (Kahlbaum, S.-P. 21°) in ein leer gewogenes Fläschchen eingefüllt, unter Vermeidung jedes Glasverlustes zugeschmolzen, wieder gewogen und das Fläschchen in einer abgemessenen Wassermenge zertrümmert; die so gewonnene Lösung enthielt 0,484% Aldehyd.

Angewandte Aldehydmenge	Verdünnung mit Wasser ccm	Versuchsmodus	Verbrauchte Menge $^n/_{10}$-Jod ccm	Entsprechend Prozent des theoretischen Wertes[1])
10 ccm = 0,0484 g	500	Nach Zusatz von 75 ccm $^n/_{10}$-Jod und eines Übersch. von Kjeldahl-Lauge kräftig geschüttelt; nach einigen Minuten mit Salzsäure angesäuert und mit Thiosulfat (Stärkekleister) titriert.	39,5	59,8
10 „ = 0,0484 „	800	Analoger Vorgang.	41,0	62,1
5 „ = 0,0242 „	500	„ „	21,4	64,8
20 „ = 0,0968 „	„	„ „	80,8	61,3
5 „ = 0,0242 „	1000	Analoger Vorgang, die Jodlösung jedoch nicht auf einmal, sondern in kleinen Portionen unter Umschütteln zugesetzt.	26,6	80,6
5 „ = „ „	„	do.	26,6	80,6
5 „ = „ „	„	„	26,1	79,0
10 „ = 0,0484 „	„	„	59,2	89,6

Diese Versuchsreihe lehrt, daß die umgesetzte Aldehydmenge nicht nur vom Verdünnungsgrade, sondern auch von anderen Versuchsbedingungen beeinflußt wird und größer ist, wenn die im Überschusse hinzugefügte Jodmenge portionenweise, als wenn dieselbe auf einmal zugesetzt wird.

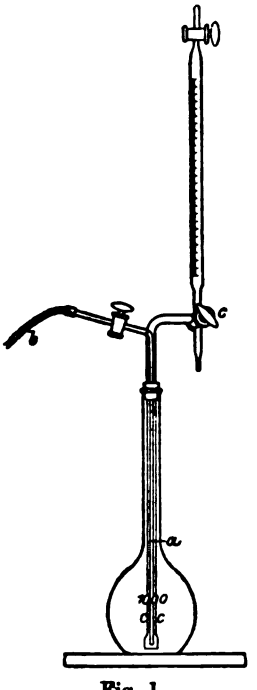


Fig. 1.

3.

Um die bei Abmessung und Umfüllung der Aldehydlösungen eintretenden Verluste ganz auszuschalten, kam eine von dem einen von uns (Charnass) angegebene Vorrichtung zur Anwendung; dieselbe bestand aus der Kombination eines mit einer Hebeeinrichtung versehenen Litermeßkolbens mit einer Glashahnbürette, die aus beistehender Zeichnung ersichtlich ist.

Das im Meßkolben bis nahe an den Boden reichende Rohr (*a*) war in seinem

[1]) d. i. 66 ccm $^n/_{10}$-Jod für 10 ccm der Aldehydlösung = 0,0484 g.

unteren Teile etwas erweitert, derart, daß das zugeschmolzene, dünnwandige, mit der genau abgewogenen Aldehydmenge gefüllte Fläschchen in derselben eingeklemmt und durch einen leichten Druck gegen den Boden des (bis zur Marke mit Wasser gefüllten) Meßkolbens zertrümmert werden konnte. Nach erfolgter Mischung wurde nunmehr die Flüssigkeit durch Blasen in das seitliche (*b*) Rohr in die Bürette gehoben und konnte nach entsprechender Stellung des Dreiweghahnes (*c*) nunmehr direkt zur Titration abgemessen werden, ohne daß irgend ein Verlust an Aldehyd durch Abdunsten zu befürchten gewesen wäre.

Mit einer so bereiteten 0,6135%igen Lösung aus konzentriertem käuflichem Aldehyd (Kahlbaum) wurden nachstehende Bestimmungen vorgenommen:

Angewandte Aldehydmenge	Verdünnung mit Wasser ccm	Versuchsmodus	Verbrauchte Menge $^n/_{10}$-Jod ccm	Entsprechend Prozent des theoretischen Wertes[1])
10 ccm = 0,06135 g	500	Geringer Überschuß von Kalilauge.	61,5	73,5
10 „ = „ „	„	Portionsweiser Zusatz der Jodlösung.	59,0	70,6
10 „ = „ „	„	do.	59,5	71,2
10 „ = „ „	1000	100 ccm Kjeldahl-Lauge + 80 ccm $^n/_{10}$-Jodlösung in kleinen Portionen unter Schütteln hinzugefügt; alkalische Lösung über Nacht stehen gelassen.	66,5	79,5
10 „ = „ „	„	Ebenso; jedoch mit 50 ccm Kjeldahl-Lauge.	64,1	76,7
10 „ = „ „	500	Die Aldehydlösung tropfenweise zu der alkalischen Jodlösung hinzugefügt.	62,0	74,1
20 „ = 0,1227 „	„	Jodlösung portionsweise zugesetzt.	131,4	78,6

4.

Da uns die käuflichen Aldehydpräparate nicht die Garantien vollkommener Reinheit zu bieten schienen, wurde eine Reindarstellung des Aldehyds in folgender Art vorgenommen:

Konzentrierter Aldehyd von Kahlbaum (Bezeichnung S.-P. 21°) wurde auf einem auf 40° erwärmten Wasserbade in eine (durch ein Chlorcalciumrohr geschützte) Vorlage destilliert. Etwa $^1/_3$ der Flüssigkeit ging bei 21° über, dann stieg aber die

[1]) d. i. 83,6 ccm $^n/_{10}$-Jod für 10 ccm Aldehydlösung = 0,06135 g.

Temperatur langsam bis über 27°. Jener Teil des Destillates, der zwischen 21 bis 26° übergegangen war, wurde in einem Kölbchen mit geschmolzenem Calciumchlorid versetzt, nach Kühlung mit Schnee zugeschmolzen und über Nacht stehen gelassen. Sodann wurde neuerlich fraktioniert. Nunmehr ging etwa die Hälfte der Flüssigkeit bei 20,8 bis 21,0° über. Dieser Anteil wurde in einer mit Eis gekühlten Vorlage aufgefangen, sogleich in einem dünnwandigen Kölbchen unter Vermeidung jedes Glasverlustes eingeschmolzen und genau gewogen, das Kölbchen sodann in dem vorbeschriebenen Bürettenapparat gebracht, unter Wasser zertrümmert und der Aldehyd so in eine 0,477%ige Lösung übergeführt.

Angewandte Aldehydmenge	Verdünnung mit Wasser ccm	Versuchsmodus	Verbrauchte Menge $^n/_{10}$-Jod ccm	Entsprechend Prozent des theoretischen Wertes[1])
10 ccm = 0,0477 g	600	Titration nach Messingers Vorschrift.	49,6	76,2
10 „ = „ „	„	do.	47,0	72,2
10 „ = „ „	800	800 ccm Wasser mit 80 ccm $^n/_{10}$-Jod + 5 ccm Kjeldahl-Lauge; sodann Aldehydlösung tropfenweise unter Umschütteln hinzugefügt; sodann noch 15 ccm Lauge; nach 5 Min. angesäuert und titriert.	48,0	73,7
10 „ = „ „	„	Ebenso; jedoch Kühlung.	49,8	75,5
10 „ = „ „	„	Portionenweiser Zusatz der Jodlösung; sorgfältige Kühlung derart, daß beim Ansäuern die Temperatur nicht über 14° steigt.	51,8	79,6
5 „ = 0,0238 „	600	Aldehydlösung in kleinen Portionen zur alkalischen Jodlösung zugefügt.	26,8	82,5
5 „ = „ „	800	Jodlösung auf einmal zu der schwach alkalischen Aldehydlösung zugefügt.	23,4	72,0
5 „ = „ „	750	40 ccm Kjeldahl-Lauge + tropfenweise 40 ccm Jod, 5 Min. energische Kühlung; dann weitere 40 ccm Lauge: Jodformausscheid.: nunmehr mit HCl angesäuert, unter energ. Kühlung, derart, daß Temp. nicht 17° übersteigt.	28,0	86,2
5 „ = „ „	„	Ebenso; Titration jedoch, statt mit Thiosulfat, mit arseniger Säure bei Gegenwart eines Überschusses von Natriumbicarbonat.	27,4	84,3

[1]) i. e. 65,1 ccm $^n/_{10}$-Jod für 10 ccm Aldehydlösung = 0,0477 g.

(Fortsetzung der Tabelle von S. 204.)

Angewandte Aldehydmenge	Verdünnung mit Wasser ccm	Versuchsmodus	Verbrauchte Menge $^n/_{10}$-Jod ccm	Entsprechend Prozent des theoretischen Wertes[1])
2 ccm = 0,00945 g	800	Verdünnte Aldehydlösung mit 40 ccm Kjeldahl-Lauge und in kleinen Portionen mit 20 ccm $^n/_{10}$-Jod versetzt. Kühlung auf 12°; klare Lösung. Nach 5 Min. weitere 40 ccm Lauge. Nunmehr erst erfolgt Jodoformabscheidg. Nach 5 Min. vorsichtige Neutralisation mit kons. Salzsäure unter Kühlung, derart, daß Temp. 20° nicht überschreitet. — Titration mit arseniger Säure bei Gegenwart von Bicarbonat.	12,0	92,2
2 „ = „ „	„	Ebenso; jedoch Titration mit Thiosulfat.	11,6	89,3
2 „ = „ „	„	do.	12,0	92,2
2 „ = „ „	„	Ebenso; geteilt: die eine Hälfte mit Thiosulfat, die andere Hälfte mit arseniger Säure titriert.	12,0	92,2
2 „ = „ „	„	Ebenso; energische Kühlung, derart, daß Temp. stets unter 10° bleibt.	13,8	106,1
1 „ = 0,00477 „	„	Ebenso.	6,7	102,9
1 „ = „ „	„	„	7,3	112,0
1 „ = „ „	„	Ebenso; jedoch ohne Kühlung.	5,6	86,0
1 „ = „ „	„	„ „ „ „	5,4	82,9
1 „ = „ „	„	„ „ „ „	5,6	86,0

5.

Überblickt man die mitgeteilten Versuchsreihen, so gelangt man zu folgendem Ergebnisse:

Die Titration nach Messinger ergibt für den Aldehyd nur unter ganz bestimmten Bedingungen brauchbare Werte. Vor allem ist zu beachten, daß die Aldehydlösungen sehr verdünnt sein müssen (etwa 0,01 bis 0,02 g auf 1 l).

Als zweckmäßigster Vorgang für die Ausführung der Bestimmung ergibt sich folgender:

Etwa 1 l der verdünnten Aldehydlösung (höchstens 0,02 g Aldehyd enthaltend) wird auf ungefähr 12° gekühlt, mit 40 ccm Kjeldahllauge und sodann mit 40 ccm $^n/_{10}$-Jodlösung in kleinen Portionen versetzt. Dabei bleibt die Flüssigkeit klar. Nach

[1]) Siehe Anm. S. 204.

5 Minuten werden weitere 40 ccm Kjeldahllauge hinzugefügt. Nunmehr erfolgt Jodoformabscheidung. Nach weiteren 5 Minuten wird unter Kühlung mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und dabei Sorge getragen, daß die Temperatur 18° nicht überschreitet. Schließlich wird in der üblichen Weise mit Thiosulfat unter Zusatz von Stärkekleister titriert.

Hat man es mit einer Lösung von unbekanntem Aldehydgehalte zu tun, so wird es zweckmäßig sein, einen aliquoten Teil derselben zu einer approximativen Bestimmung zu verwenden und den Rest dann abermals nach entsprechender Verdünnung auf die optimale Konzentration zu analysieren.

Bei Nichtbeachtung dieser Vorsichten ergibt die Titration des Aldehydes nach Messinger ganz ungenügende Resultate.

So erhielt Boas[1]) bei Titration von 5 ccm einer 0,479%igen Aldehydlösung von chemisch reinem Aldehyd (= 0,0239 g Aldehyd) einen Verbrauch von im Mittel 14,4 ccm $^n/_{10}$-Jodlösung, während diese Aldehydmenge theoretisch $\frac{0,0239}{0,000733} = 32,6$ ccm $^n/_{10}$-Jod erfordert. Die Titration hat also in diesem Falle nur 44,2% des richtigen Wertes ergeben.

Unter ähnlich ungünstigen Bedingungen hat Jerusalem seine Probetitrationen mit bekannten Mengen wenig verdünnten reinen Aldehyds ausgeführt und dadurch, daß dieselben nur etwa die Hälfte des richtigen Wertes ergaben, konnte er in Unkenntnis des Fehlers bleiben, den er durch die Annahme beging, daß 1 Molekül Aldehyd 3 Atome Jod (statt 6 Atome Jod) erfordert. Ein Fehler war eben durch den anderen annähernd kompensiert worden.

Zieht man weiterhin die Umstände in Betracht, unter denen Jerusalem bei seinen Milchsäurebestimmungen die Menge des auf oxydativem Wege abgespaltenen Aldehyds titrimetrisch bestimmt hatte, so ergibt sich, daß dabei im Mittel nur 73% (als Mittelwert aus 13 Analysen berechnet) des tatsächlich vorhandenen Aldehyds in Reaktion getreten sein dürften.

Wenn also Jerusalem in einem Versuche z. B. eine Aldehydausbeute = 98% des theoretischen Wertes gefunden zu haben meinte, so dürfte dieselbe tatsächlich unter Anrechnung des Rechnungs- und Titrationsfehlers etwa 67% betragen haben.

Wir kommen sonach zu dem Schlußergebnisse, daß die Jodoformmethode auf die Aldehydtitration zwar anwendbar ist, jedoch nur unter Einhaltung ganz bestimmter Bedingungen (hochgradige Verdünnung der Aldehydlösung, Zusatz der Jodlösung in

[1]) l. c.

kleinen Portionen zur stark alkalischen Lösung, niedere Temperatur während des ganzen Vorgangs) praktisch brauchbare und annähernd richtige Werte liefert.

Die Methode bleibt in ihren Leistungen, wie die weiter unten auszuführenden Versuche ergeben, weit hinter dem Ripperschen Verfahren zurück.

II. Quantitative Aldehydbestimmung nach dem Ripperschen Verfahren.

Wir haben uns nunmehr einer Nachprüfung des von Ripper[1]) angegebenen maßanalytischen Aldehydbestimmungsverfahrens zugewendet.

Dasselbe beruht darauf, daß eine Aldehydlösung mit einer Kaliumhydrosulfitlösung von titrimetrisch ermitteltem Gehalte versetzt wird. Es erfolgt eine Bindung des Sulfits durch den Aldehyd, und der Sulfitüberschuß wird nunmehr auf jodometrischem Wege bestimmt.

Da ein Molekül Aldehyd ein Molekül des Hydrosulfits bindet, die schweflige Säure aber bekanntlich mit Jod nach der Gleichung $SO_2 + J_2 + 2\,H_2O = H_2SO_4 + 2\,HJ$ reagiert, entspricht je 1 ccm $^n/_{10}$-Jod je $^1/_2$ ccm $^n/_{10}$-Aldehyd oder

$$\frac{0{,}0044}{2} = 0{,}0022 \text{ g Aldehyd.}$$

Also z. B.: 25 ccm einer Aldehydlösung werden mit 50 ccm einer Kaliumhydrosulfitlösung versetzt. Diese 50 ccm des Hydrosulfits vermögen, wie die gleichzeitig ausgeführte jodometrische Bestimmung lehrt, 58,3 ccm $^n/_{10}$-Jod umzusetzen.

Nach $^1/_4$ Stunde wird die unverbrauchte Menge des Sulfits mit Jod bei Gegenwart von Stärkekleister zurücktitriert; der Jodverbrauch beträgt nunmehr 5,2 ccm $^n/_{10}$-Jod. Demnach hat die in den Versuch gebrachte Aldehydmenge $58{,}3 - 5{,}2 = 53{,}1$ ccm $^n/_{10}$-Jod verbraucht; dieselbe beträgt sonach $53{,}1 \times 0{,}0022 = 0{,}1168$ g Aldehyd.

1.

Zu den nachfolgenden Versuchen diente die $0{,}477\,^0/_0$ige Lösung reinsten Aldehyds, die bei der letzterwähnten Versuchsreihe zur Anwendung gelangt war.

---

[1]) M. Ripper, Eine allgemein anwendbare maßanalytische Bestimmung der Aldehyde. Monatshefte f. Chem. 21, 1079 und gleichlautend. Sitzungsber. d. Wien. Akad. 109, 845, 1900.

Angewandte Aldehydmenge		Verdünnung mit Wasser	Vorgelegtes Bisulfit entsprechend einer Jodmeng. $^n/_{10}$-Jod	Verbrauchte Jodmenge $^n/_{10}$-Jod	Daraus berechnete Aldehydmenge	
ccm	g		ccm	ccm	g	entspricht Prozent des geforderten Wertes
40	0,1908	—	100	86,1	0,1894	99,2
25	0,1192	—	58,3	53,1	0,1168	98,0
„	„	—	57,0	52,5	0,1155	96,9
„	„	—	57,0	52,9	0,1164	97,6
„	„	—	60,0	53,5	0,1177	98,7
„	„	—	61,3	51,9	0,1142	95,8
„	„	—	61,3	52,2	0,1148	96,3
20	0,0954	—	47,3	41,3	0,0908	95,3
16	0,0763	—	48,0	33,9	0,0746	97,7
10	0,0477	—	47,2	19,6	0,0431	90,3
„	„	—	47,2	21,3	0,0469	98,2
„	„	500	28,2	19,5	0,0429	89,9
„	„	200	47,1	22,3	0,0490	102,7
„	„	—	25,0	21,5	0,0473	99,1
8	0,03816	—	25,0	17,0	0,0374	98,0
5	0,0238	—	47,0	10,3	0,0226	95,0
„	„	—	20,0	10,2	0,0224	94,2
„	„	—	15,0	10,2	0,0224	94,2
„	„	500	12,4	10,1	0,0222	93,3
4	0,01908	—	10,0	8,6	0,0189	99,2
3	0,0143	—	9,0	6,4	0,0141	98,4
„	„	300	6,6	6,1	0,0134	93,7
2	0,0095	—	6,0	4,3	0,0095	100,0
„	„	300	5,6	3,9	0,0086	90,5
1	0,0048	—	5,0	2,2	0,0048	100,0
„	„	—	5,0	2,2	0,0048	100,0
„	„	300	4,7	1,9	0,0041	86,8

2.

Es wurde weiterhin ein Präparat von reinstem Aldehyd in folgender Weise hergestellt:

Ein Präparat „Aldehyd absolut Merck“ wurde der Destillation unterworfen. Dasselbe zeigte keinen konstanten Siedepunkt. Die zwischen 23 bis 28° übergehende Fraktion wurde abgetrennt, über geschmolzenem Calciumchlorid stehen gelassen und das zwischen 22 bis 26° übergehende Destillat gesondert weiter verarbeitet. Dasselbe wurde nochmals mit Calciumchlorid stehen gelassen. Bei neuerlicher Destillation unter Eiskühlung in eine durch Calciumchlorid geschützte Vorlage wurde nunmehr ein Präparat erhalten, das einen konstanten Siedepunkt von 20,2 bis 20,8° aufwies. Dasselbe wurde sogleich eingeschmolzen, gewogen und mit Hilfe des oben beschriebenen Bürettenapparates in eine 0,80568%ige Lösung übergeführt.

Titrationsversuche ergaben:

Angewandte Aldehydmenge		Vorgelegtes Bisulfit entsprechend einer Jodmenge $^n/_{10}$-Jod	Verbrauchte Jodmenge $^n/_{10}$-Jod	Daraus berechnete Aldehydmenge	
ccm	g	ccm	ccm	g	entspricht Prozent des geforderten Wertes
5	0,0403	23,7	17,8	0,0392	97,2
10	0,0806	47,5	36,7	0,0807	100,1
15	0,1208	61,7	54,3	0,1195	98,9

Das Rippersche Verfahren leistet also Vorzügliches und kommen die damit erzielten Werte, von hochgradigen Verdünnungen abgesehen, den theoretischen Werten außerordentlich nahe. Auch ist die Anwendung desselben eine so bequeme und so wenig zeitraubende, daß wir nicht im Zweifel darüber sein konnten, daß das Jodoformverfahren bei der Milchsäurebestimmung zu verlassen und durch das Rippersche Verfahren zu ersetzen sei.

3.

Destillation des Aldehyds. Wir haben weiterhin Versuche ausgeführt, um uns zu vergewissern, daß der von uns angewandte, weiter unten zu beschreibende Destillationsapparat derart beschaffen war, daß man auf eine vollständige Absorption des aus einer Reaktionsflüssigkeit abdestillierenden Aldehyds in den Vorlagen rechnen konnte.

a) 20 ccm einer Aldehydlösung 0,477% (= 0,0954 g) wurden mit 300 ccm Wasser in den Kolben des Destillationsapparates gebracht und die Destillation durchgeführt. Das Destillat wurde auf 250 ccm aufgefüllt und in 2 Proben zu 100 ccm die Bestimmung nach Ripper vorgenommen. Die verbrauchte Jodmenge betrug: $\left.\begin{matrix}16{,}4\\15{,}8\end{matrix}\right\}$ Mittel 16,1 ccm $^n/_{10}$-Jod für 100 ccm des Destillates, somit für die Gesamtmenge des Destillates $16{,}1 \times 2{,}5 = 40{,}25$ ccm, entsprechend einer Aldehydmenge $40{,}25 \times 0{,}0022 = 0{,}0886$ Aldehyd. Ausbeute: 92,3%.

Die direkte Titration derselben Aldehydlösung ergab für 10 ccm Aldehydlösung (0,0477) einen Jodverbrauch 20,6 ccm $^n/_{10}$-Jod, entsprechend 0,0453 g Aldehyd und einer Ausbeute von 95,0%.

b) Destillation bei Gegenwart von Permanganat. 25 ccm einer Aldehydlösung 0,8056% (= 0,2014 g) wurden mit 300 ccm Wasser in den Kolben des Destillationsapparates gebracht und während der Destillation 5 ccm einer halbnormalen Permanganatlösung zugetropft. Das Destillat wurde auf 300 ccm aufgefüllt und in 3 Portionen zu je 100 ccm nach Ripper titriert. Der Jodverbrauch betrug 29,4 + 30,9

+29,5 = 89,8 ccm $^n/_{10}$-Jod, entsprechend 89,8 × 0,0022 = 0,1975 g Aldehyd und einer Ausbeute von 98,1 %.

c) Destillation aus schwefelsaurer Lösung bei Gegenwart von Permanganat. 25 ccm einer Aldehydlösung 0,8056 % (= 0,2014 g) wurden mit 300 ccm Schwefelsäure 1 % unter Zutropfen von 10 ccm halbnormaler Permanganatlösung destilliert. Die Gesamtmenge des Destillates verbrauchte 83,9 ccm $^n/_{10}$-Jod, entsprechend 0,1846 g Aldehyd und einer Ausbeute von 91,7 %.

III. Oxydative Aldehydabspaltung aus Milchsäure.

1. Prinzip.

Nachdem so durch Ermittlung eines zweckmäßigen Vorganges bei der Ausführung der Aldehydbestimmung eine feste Basis gewonnen war, konnten wir nunmehr an die Milchsäurebestimmung als solche herangehen.

Was zunächst das Prinzip derselben betrifft, haben wir dabei das Verfahren Jerusalems verlassen und von demselben nur einen Bestandteil, nämlich das Eintropfen des Permanganats in die kochende, schwefelsäurehaltige Milchsäurelösung beibehalten. Eine sehr wichtige Abweichung ergab sich jedoch auch hierbei, insofern wir eine Schwefelsäurekonzentration von über 5 % als durchaus unzweckmäßig und für die Aldehydausbeute nachteilig fanden, während Jerusalem zu 100 bis 150 ccm seiner Milchsäurelösung 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt, demnach eine weit höhere Schwefelsäurekonzentration angewendet hatte. Dieser Umstand dürfte in erster Linie seine geringen Aldehydausbeuten, die, wie oben erwähnt, tatsächlich nur etwa 67 % betrugen, verschuldet haben.

Wir haben ferner die Bestimmung nicht, wie Jerusalem, unter Durchleitung eines Luftstromes durchgeführt, sondern in einem geschlossenen System; es ist dies zweifellos ein Vorteil, da immerhin die Gefahr besteht, daß der Luftstrom kleine Aldehydmengen durch die Vorlage hindurch entführt, vor allem aber deshalb, weil damit die Notwendigkeit einer komplizierten Apparatur entfällt und dieselbe durch einen einfachen Destillationsapparat ersetzt werden kann.

Wir haben schließlich, wie erwähnt, die Aldehydbestimmung nach Messinger durch diejenige nach Ripper ersetzt und die der ersteren anhaftenden Fehlerquellen somit ausgeschaltet.

2. Versuchsanordnung.

Unsere Versuchsanordnung[1]) wird aus beistehender Zeichnung ersichtlich.

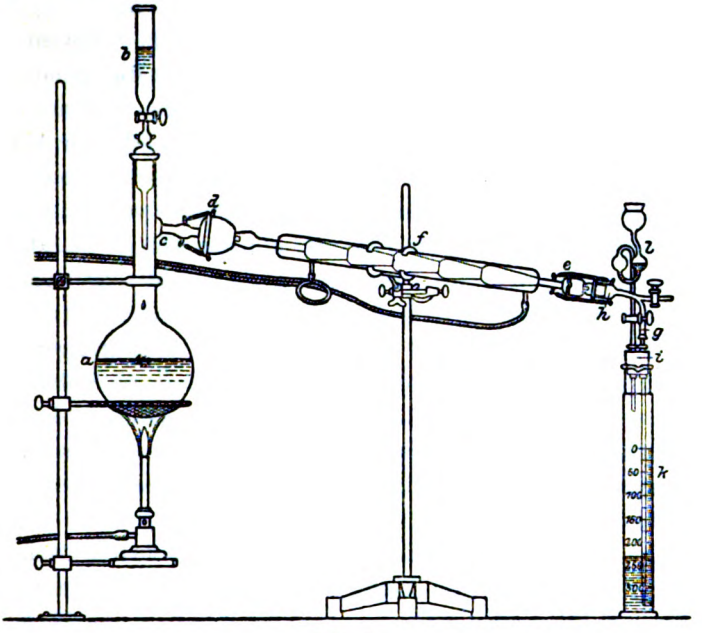


Fig. 2.

Der ca. $^3/_4$ l fassende Jenaer Kolben *a* ist zur Aufnahme der zu analysierenden Milchsäure-Lösung sowie von 300 ccm verdünnter (am besten $1\,^0/_0$iger) Schwefelsäure bestimmt. Derselbe trägt den mittels eines (mit Spiralfedern versicherten) Glasschliffes eingepaßten, mit einer Teilung versehenen 50 ccm fassenden Tropftrichter *b*, der in ein in eine Spitze ausgezogenes Rohr ausläuft und zur Aufnahme einer $^n/_{10}$-Permanganatlösung bestimmt ist.

Seitlich trägt der Kolben ein nicht zu enges Ansatzrohr *c*, das ihn mit dem Kühler verbindet.

Wir haben, um unter möglichst reinen Versuchsbedingungen zu arbeiten und da wir Verluste an Aldehyd durch Berührung der Dämpfe desselben mit Kautschuk befürchteten, den Kühler

[1]) Der Apparat wird hergestellt von der Glasbläserei H. Gareis, Wien IX., Hörlgasse.

mit dem Destillationskolben und dem Vorstoße durch Glasschliffe *d* und *e* verbunden, und zwar benützten wir solche von halbkugeliger Form, wie sie von dem einen von uns (Charnass) angegeben worden sind. Dieselben besitzen gegenüber den gewöhnlichen Glasschliffen den großen Vorteil der freien Beweglichkeit eines Kugelgelenkes, was die Manipulationen außerordentlich erleichtert. An Glashäkchen festgemachte Spiralfedern aus Metall drücken die beiden Schliffe der Kugelgelenke gegeneinander und sichern den Schluß derselben.

Wir haben uns jedoch später durch Parallelversuche davon überzeugt, daß auch Kautschukverbindungen keinen merklichen Aldehydverlust bewirken. Die Glasschliffe *d* und *e* können also ohne weiteres durch gewöhnliche Kautschukstopfen ersetzt werden.

Der Kühler *f* besitzt ein Kühlrohr mit birnförmigen Ausnehmungen. Dieselben kommen nicht nur dem Kühleffekte zustatten, sondern verhindern auch das Zurücksteigen der Vorlagenflüssigkeit in den Destillationskolben und machen so das Rückschlagventil *g*, das wir vorsichtshalber in dem Vorstoße *h* angebracht hatten, überflüssig.

Der letztere ist durch einen doppelt gebohrten Gummistopfen *i* mit dem als Vorlage dienenden 300 ccm fassenden Meßzylinder *k* verbunden. Die zweite Bohrung des Stopfens trägt den Kugeltrichter *l*, der einen Wasserverschluß des Systems ermöglicht. Im Interesse einer bequemeren Manipulation und um den Kugeltrichter *l* und den Vorstoß *h* jederzeit leicht aus dem Stopfen *i* herausnehmen zu können, hatten wir in die Bohrungen des Stopfens Glasröhrchen eingepaßt, die wiederum die Röhren des Kugeltrichters und des Vorstoßes mittels Schliffen aufnahmen. Doch kann auch diese Komplikation selbstverständlich wegbleiben und der Apparat überhaupt mit den einfachsten Mitteln improvisiert werden.

Nach Beendigung des Versuches wird der Apparat auseinander genommen und der Gummistopfen *i* im Messingzylinder, der nunmehr das Destillat enthält, durch einen eingeschliffenen Glasstöpsel ersetzt.

3. Ausführung der Milchsäurebestimmung.

Die Ausführung einer Milchsäurebestimmung gestaltet sich nun folgendermaßen:

Der Kolben *a* wird mit 300 ccm verdünnter Schwefelsäure (am besten 1%ig) und mit der zu analysierenden Milchsäurelösung beschickt. Die Menge der Milchsäure wird zweckmäßigerweise 0,4 g nicht überschreiten.

Sodann wird der Tropftrichter *b* durch Ansaugen (mit Hilfe eines in seine obere Öffnung eingepaßten Gummistopfens mit Schlauchansatz) von unten her mit einer $^n/_{20}$-Kaliumpermanganatlösung bis zum Beginne seiner 50 ccm fassenden Teilung gefüllt und dabei darauf geachtet, daß sich unterhalb des Glashahnes nicht etwa Luftblasen befinden. Der gefüllte Tropftrichter wird fest in den für ihn bestimmten, leicht gefetteten Glasschliff eingesetzt und der Verschluß durch Einhängen der Spiralfedern versichert.

Jetzt wird der Meßzylinder *k* mit etwa 50 ccm Wasser beschickt, der Gummistopfen *i* eingesetzt, der Vorstoß *h* eingefügt, dieser mit dem Kühler *f* und der letztere durch das Ansatzrohr *c* mit dem Destillationskolben verbunden. Nunmehr setzt man noch den Kugeltrichter *l*, dessen Kugeln zur Hälfte mit Wasser gefüllt sind, in die für ihn bestimmte Bohrung des Gummistopfens *i* ein und überzeugt sich endlich von dem genauen Schlusse aller Verbindungen und dem Funktionieren der Kühlung.

Nunmehr wird die Flüssigkeit in Destillationskolben *a* mit Hilfe eines Drahtnetzes vorsichtig angeheizt und zum Kochen gebracht. Man setzt das Kochen so lange fort, bis alle Luft aus dem Apparate vertrieben ist und die Flüssigkeit der Vorlage in dem Vorstoße *h* zurückzusteigen beginnt. Erst dann wird mit der Oxydation begonnen, und zwar in der Weise, daß man, während die Flüssigkeit im Destillationskolben in mäßigem Sieden erhalten wird, die Permanganatlösung tropfenweise zufließen läßt. Der Zufluß wird derart reguliert, daß stets bereits Entfärbung der Flüssigkeit stattgefunden hat, wenn der nächste Tropfen hineingelangt, die Destillation etwa derart, daß die Tropfen aus dem Tropftrichter und dem Kühler ungefähr im gleichen Rhythmus fallen.

Man erkennt das Ende der Milchsäureoxydation daran, daß die Flüssigkeit sich nach dem Einfallen der Permanganattropfen nicht mehr entfärbt, vielmehr eine braunrote Färbung annimmt und sich (infolge Braunsteinabscheidung) trübt.

Man liest nunmehr den Permanganatverbrauch am Tropftrichter ab, läßt noch einige Kubikzentimeter Permanganat zufließen und setzt die Destillation weiter fort, bis noch etwa weitere 100 ccm übergegangen sind. Dann trennt man die Verbindung zwischen Kühler und Vorstoß, entfernt den Gummistopfen *i*, spült den Inhalt des Kugeltrichters *l* in den Meßzylinder *k*, füllt auf 300 ccm auf, verschließt den Zylinder mit dem zugehörigen eingeschliffenen Glasstöpsel und mischt gut durch.

Die Aldehydbestimmung im Destillate wird nun in folgender Art vorgenommen:

Das 300 ccm betragende Destillat teilt man nunmehr in 3 gleiche Portionen, indem man mit einer Pipette je 2 Portionen zu 100 ccm in 2 etwa 400 ccm fassende Glasstöpselflaschen abmißt; die 3. Portion bleibt im Meßzylinder zurück.

Jede dieser Portionen wird nunmehr mit einer abgemessenen Menge einer annähernd $^n/_{10}$-Kaliumhydrosulfitlösung (bereitet durch Auflösen von 6 g Kaliumhydrosulfit in 1 l Wasser) versetzt, und zwar muß dieser Zusatz derart bemessen sein, daß aller im Destillate vorhandene Aldehyd gebunden werden kann und dann noch ein nicht allzu kleiner Sulfitüberschuß übrig bleibt.

0,1 g Milchsäure liefert theoretisch 0,04898 Aldehyd, d. i. eine Menge, die befähigt ist, 22,22 ccm $^n/_{10}$-$KHSO_3$ zu binden, also eine Bisulfitmenge, die 22,22 ccm $^n/_{10}$-Jod erfordert. Für die Gesamtmenge des Destillates genügt also je 40 ccm $^n/_{10}$-$KHSO_3$, entsprechend je 0,1 Milchsäure.

Ein Maß für die Menge vorhandener Milchsäure bietet der Verbrauch an Permanganat bis zur Beendigung der Oxydation.

1 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure erfordert zur Oxydation in saurer Lösung nach der Gleichung $CH_3.CH(OH).COOH + O = CH_3.COH + H_2O + CO_2$, je 1 ccm $^n/_{10}$-O oder 2 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$.

Andererseits liefert je 1 ccm $^n/_{10}$-Milchsäure je 1 ccm $^n/_{10}$-Aldehyd, dieser bindet 2 ccm $^n/_{10}$-$KHSO_3$ und diese wiederum 2 ccm $^n/_{10}$-Jod.

Der schließliche Verbrauch an Kubikzentimeter $^n/_{10}$-Jod bei der Titration nach Ripper sollte also theoretisch gleich sein der Zahl Kubikzentimeter $^n/_{10}$-$KMnO_4$, der zur Oxydation der Milchsäurelösung gebraucht wird. Und wenn sich diese Werte auch in praxi nicht vollkommen decken, so orientiert uns doch der Permanganatverbrauch in ausreichender Weise über die zu erwartende Aldehydmenge.

Man läßt die mit dem Bisulfitüberschusse versetzten aldehydhaltigen Destillate nunmehr nach kräftigem Umschütteln mindestens $^1/_4$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen.

Man benützt diese Zeit, um den Titer der angewandten Bisulfitlösung zu stellen, und zwar indem man mehrere Portionen derselben zu je 20 ccm Wasser verdünnt und nach Zusatz einer klaren Lösung von löslicher Stärke mit $^n/_{10}$-Jodlösung titriert. Der Mittelwert dieser Bestimmungen wird als Titer der angewandten Bisulfitlösung in Rechnung gebracht. Derselbe ist sehr veränderlich und verschiebt sich von einem Tage zum andern in sehr merklicher Weise.

Schließlich wird jede der 3 Portionen nach Zusatz von Stärkelösung mit $^n/_{10}$-Jodlösung bis zur beginnenden Blaufärbung titriert. Eine Übertitration kann durch Mehrzusatz von Bisulfitlösung aus einer Bürette kompensiert werden.

Die Art der Analysenberechnung mag durch ein Beispiel klargemacht werden:

30 ccm einer 0,5423 %igen Lösung von milchsaurem Lithium, 0,1525 g freie Milchsäure enthaltend, werden zu 300 ccm Wasser hinzugefügt; nach Zusatz von 3 ccm konz. Schwefelsäure wird die Oxydation durch Zutropfen von 40 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$ vorgenommen. Das Destillat wird auf 300 ccm aufgefüllt. Das Destillat wird in 3 Portionen geteilt:

a) 100 ccm Destillat: 20 ccm $KHSO_3$ (Titer: 10 ccm $KHSO_3$ = 9,1 ccm $^n/_{10}$-Jod) vorgelegt; 0,2 ccm $KHSO_3$ übertitriert.

Im ganzen vorgelegt: 20,2 ccm $KHSO_3$ entsprechend 18,4 ccm $^n/_{10}$-Jod
Zurücktitriert . . . . . 7,6 „ „
Verbraucht 10,8 „ „

b) 100 ccm Destillat:
Vorgelegt 20 ccm $KHSO_3$, entsprechend 18,2 ccm $^n/_{10}$-Jod
Zurücktitriert . . . . . 8,1 „ „
Verbraucht 10,1 „ „

c) 100 ccm Destillat:
Vorgelegt 20 ccm $KHSO_3$, entsprechend 18,2 ccm $^n/_{10}$-Jod
Zurücktitriert . . . . . 8,1 „ „
Verbraucht 10,1 „ „

1 ccm $^n/_{10}$-Jod entspricht $^1/_2$ ccm $^n/_{10}$-Aldehyd, demnach $^1/_2$ ccm $^n/_{10}$-Milchsäure = 0,0045 g Milchsäure.

Im ganzen für 300 ccm Destillat verbraucht 10,8
10,1
10,1
31,0 ccm $^n/_{10}$-Jod
= 31,0 × 0,0045 g = 0,1395 g Milchsäure.

Ausbeute: $x : 100 = 0{,}1395 : 0{,}1525$.
$x = 91{,}4\,\%$.

Eine Milchsäurebestimmung ist nach der beschriebenen Methode mit Einschluß der Vorbereitungen leicht innerhalb

2 Stunden ausführbar, ohne während dieser Zeit ständige Beaufsichtigung zu erfordern. Stehen 2 Apparate zur Verfügung, so ist die gleichzeitige Anstellung von Doppelbestimmungen leicht durchführbar.

4. Analysenmaterial.

Als Material für unsere Analysen benützten wir, der Empfehlung von Hoppe-Seyler und Araki[1]) entsprechend, das Lithiumsalz der Milchsäure, das durch seine hervorragende Krystallisationsfähigkeit, seine Leichtlöslichkeit, seinen Mangel an Krystallwasser und durch die Möglichkeit, dasselbe unzersetzt scharf zu trocknen, für diesen Zweck besonders geeignet erscheint.

Eine Reihe unserer Analysen wurden mit dem käuflichen Kahlbaumschen Präparate ausgeführt (A).

Um etwa anhaftende alkohollösliche Salze von Fettsäuren u. dgl. mit Sicherheit zu entfernen, wurde weiterhin ein Präparat von milchsaurem Lithium (Kahlbaum) 2mal mit absolutem Alkohol ausgekocht, aus Wasser umkrystallisiert, die Mutterlauge scharf abgesaugt, das Salz bei 110° zur Gewichtskonstanz getrocknet (B).

Das Präparat wurde, um seine Reinheit zu konstatieren, auf seinen Lithiumgehalt untersucht.

a) 0,5675 g milchsaures Lithium gaben 0,2095 Li_2CO_3: Li = 6,98%
b) 0,2895 g „ „ „ 0,1595 Li_2SO_4: Li = 7,01%
c) 0,6316 g „ „ „ 0,3566 „ : Li = 7,19%
d) 0,7308 g „ „ „ 0,4098 „ : Li = 7,14%

Milchsaures Lithium erfordert theoretisch 7,29%.

Um jedoch jeden Zweifels über die Reinheit unseres Analysenmaterials überhoben zu sein, gingen wir bei einer weiteren Darstellung von dem schwer löslichen Zinklactat aus, da zu erwarten war, daß dasselbe von allen leicht löslichen Beimengungen von vornherein frei sei und führten dieses in das Lithiumlactat über.

Zu diesem Zwecke wurden 50 g krystallisierten Zinklactates (Kahlbaum) in 500 ccm heißen Wassers unter Zusatz eines großen Überschusses sirupöser Phosphorsäure gelöst. Die klare

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 365.

Lösung wurde mit der 4fachen Menge reinen Kahlbaumschen Äthers ausgeschüttelt, die abgetrennte ätherische Lösung durch ein trockenes Doppelfilter gegossen. Sodann wurde die wässerige Schicht mit Ammonsulfat gesättigt und nochmals mit Äther ausgeschüttelt. Der nach Abdunsten des Äthers aus den vereinigten ätherischen Lösung resultierende Sirup wurde in Wasser gelöst, die Lösung mit einem Überschusse von Lithiumcarbonat gesättigt, bis kein Aufbrausen mehr erfolgte und alkalische Reaktion eingetreten war; nun wurde tropfenweise sirupöse Milchsäure (Kahlbaum) hinzugefügt, bis die Reaktion wieder stark sauer geworden war. Beim Einengen am Wasserbade schied sich ein Krystallbrei ab, dieser wurde auf einem gehärteten Nutschfilter gesammelt, gründlich mit 95%igem, dann wiederholt mit heißem absolutem Alkohol, schließlich mit Äther gewaschen und bei 108° getrocknet (C).

Ein Einfluß dieser Reinigungsprozeduren auf die Analysenresultate dem käuflichen Salze gegenüber war übrigens nicht wahrnehmbar.

5. Analysen von milchsaurem Lithium.

Wir teilen nunmehr eine Reihe von Bestimmungen in tabellarischer Form mit (S. 218), die zur Prüfung des Milchsäurebestimmungsverfahrens mit bekannten Mengen milchsaurem Lithium ausgeführt worden sind.

Den Analysen haftet also ein mittlerer Fehler von etwa 11% an. Derselbe dürfte durch Überoxydation des Aldehyds bedingt sein.

Wir haben zahlreiche Versuche ausgeführt, um diesen Fehler auszuschalten. So versuchten wir die Erhöhung der Schwefelsäurekonzentration über 5 und ihre Herabsetzung unter $^1/_2$%, den Ersatz der Schwefelsäure durch Phosphorsäure und Essigsäure, den Ersatz der Permanganatlösung durch Braunstein. Wir versuchten ferner, die Schwefelsäure sowie die Milchsäurelösung allmählich zutropfen zu lassen, statt sie von vornherein zuzusetzen u. dgl. Alle diese Versuchsmodifikationen bewirkten eine Abnahme der Aldehydausbeute, die auch (s. o.) durch Sättigung der Reaktionsflüssigkeit mit Neutralsalzen (um die Austreibung des Aldehyds etwa zu erleichtern und Kondensationsvorgänge zu erschweren) nicht gesteigert werden konnte.

Tabelle.

Präparat	Vorgelegtes milchsaures Lithium ccm	Vorgelegtes milchsaures Lithium %	Enthält freie Milchsäure g	Verbrauch von $^n/_{10}$-Jod ccm	Gefundene Milchsäure g	Gefundene Milchsäure Prozente der vorgelegten Menge	Versuchsmodus
A	20	0,986	0,1849	36,3	0,1633	88,3	300 ccm H_2SO_4 1% + 40 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$
B	30	0,7735	0,2175	43,3	0,1949	89,6	„ „ „ 3% + 53 „ „
„	„	„	„	42,8	0,1920	88,3	„ „ „ 3% + 52 „ „
„	„	„	„	42,2	0,1913	87,9	„ „ „ 1% + 90 „ $^n/_{20}$-$KMnO_4$
„	„	„	„	44,3	0,1984	91,2	„ „ „ 1% + 10 „ $^n/_2$-$KMnO_4$ + 30 g Na_2SO_4
„	„	„	„	45,0	0,2025	93,1	„ „ „ 1% + 12 „ „ + 90 „ $MgSO_4$
„	„	„	„	43,4	0,1953	89,8	„ „ „ 2% + 17 „ „ + 90 „ „
„	15	0,7735	0,1087	21,6	0,0972	89,4	„ „ „ 2% + 10 „ „ + 120 „ „
„	60	0,7735	0,4350	85,8	0,3860	88,7	„ „ „ 2% + ca. 40 „ „
„	30	0,5423	0,1525	29,35	0,1321	86,7	„ „ „ 1% + 37 „ $^n/_{10}$-$KMnO_4$
„	60	„	0,3050	62,5	0,2813	92,2	„ „ „ 1% + 75 „ „
„	„	„	„	61,3	0,2760	90,5	„ „ „ 1% + 75 „ „
„	30	„	0,1525	29,4	0,1323	86,7	„ „ „ 2% + 40 „ „ + 100 „ „
„	30	„	„	31,0	0,1395	91,4	300 ccm H_2SO_4 2% + 40 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$ + 100 g Magnesiumsulfat
„	10	„	0,05084	10,2	0,0459	90,2	300 ccm H_2SO_4 2% + 15 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$
„	30	„	0,1525	30,3	0,1364	89,5	„ „ „ 1,5% + 50 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$ + Magnesiumsulfat bis zur Sättigung
„	60	„	0,3050	60,0	0,2750	90,2	300 ccm H_2SO_4 1,5% + 95 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$ + Magnesiumsulfat bis zur Sättigung
C	60	0,35318	0,19866	40,0	0,1800	90,6	300 ccm H_2SO_4 1,5% + 55 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$
„	25	0,2808	0,0656	12,6	0,0567	86,4	„ „ „ 2% + 15 „ „
„	100	„	0,2632	51,0	0,2295	87,2	„ „ „ 2% + 65 „ „
„	50	„	0,1316	27,2	0,1224	93,0	
„	100	„	0,2632	50,9	0,2291	86,9	„ „ „ 0,75% + 60 „ „
„	100	0,1936	0,1815	34,7	0,1562	86,1	„ „ „ 0,75%
					Mittel	89,2 [1]	Permanganatlösung in dünnem Strahle einfließen gelassen!

[1] **Eine ähnliche Ausbeute dürfte auch Embden erhalten haben, der, wie er uns schriftlich mitteilt, bei vorsichtiger Oxydation und bei Anwendung eines einfachen Destillationsapparates bis 70% wiederfand. Da er sich der Jodoformmethode in der von Jerusalem angegebenen Art bediente, dürften seine tatsächlichen Aldehydausbeuten sich in der Größenordnung unserer Versuche bewegt haben.**

Der Fehler, der unserem Verfahren anhaftet, ist, wie ein Blick auf obige Tabelle lehrt, ein so konstanter, daß man versuchen kann, ihm (solange es noch nicht gelungen ist, denselben durch eine Verbesserung des Verfahrens auszuschalten) durch eine Korrektur Rechnung zu tragen.

Will man dies tun, so wird man es in der Weise erreichen können, daß man bei Berechnung der Analysen die Zahl der bei der Bestimmung nach Ripper verbrauchten Kubikzentimeter $^n/_{10}$-Jodlösung, statt mit dem theoretischen Faktor 0,0045 mit dem um 11% vermehrten Faktor 0,045 + 0,000495, also (abgerundet) mit 0,005 multipliziert, um die Gewichtsmenge Milchsäure zu ermitteln.

Wir werden es nunmehr als unsere Aufgabe betrachten, das Verfahren der Milchsäureextraktion aus Blut, Harn, Milch und tierischen Geweben einer Revision zu unterziehen.

Zusammenfassung.

1. Die titrimetrische Aldehydbestimmung nach der Jodoformmethode liefert nur unter Einhaltung ganz bestimmter Versuchsbedingungen (hochgradige Verdünnung der Aldehydlösung, Zusatz der Jodlösung in kleinen Portionen zu der stark alkalischen Lösung, Einhaltung einer niederen Temperatur während des ganzen Prozesses) praktisch brauchbare Werte.

2. Die Methode wird in ihrer Leistungsfähigkeit von dem auf Bisulfitaddition basierenden jodometrischen Verfahren nach Ripper ganz beträchtlich übertroffen. Dieses liefert unter den verschiedensten Versuchsbedingungen Werte, die den theoretischen Werten außerordentlich nahe kommen.

3. Die oxydative Aldehydabspaltung aus Milchsäure verläuft unter gewissen Versuchsbedingungen, wenn auch nicht geradezu quantitativ, so doch derart gleichmäßig, daß ein quantitatives Verfahren der Milchsäurebestimmung sehr wohl auf diesem Prinzip basiert werden kann.

4. Die wesentlichen von uns eingeführten Modifikationen des Verfahrens beziehen sich auf die Elimination eines komplizierten Apparates und den Ersatz desselben durch eine einfache Destillationsvorrichtung, auf die Ausschaltung der Luftdurchleitung während der Bestimmung, auf die Herab-

setzung der Schwefelsäurekonzentration, bei der die Permanganatoxydation der Milchsäure vorgenommen wird und auf den Ersatz der Jodoformmethode durch das Rippersche Verfahren bei der titrimetrischen Aldehydbestimmung.

5. Die Aldehydausbeute betrug in 23 Kontrollanalysen mit milchsaurem Lithium 86,1 bis 93,1, im Mittel 89,2% des theoretisch geforderten Wertes. Dem sehr konstanten Fehler kann Rechnung getragen werden, indem man bei den Analysen nach Ripper die Zahl der verbrauchten Kubikzentimeter $^{n}/_{10}$-Jodlösung (statt mit dem theoretischen Faktor 0,0045) mit 0,005 multipliziert, um die Gewichtsmenge Milchsäure zu ermitteln.

Bemerkungen zu den „Studien über Kataphorese von Fermenten und Kolloiden" von H. Iscovesco[1]).

Von

A. v. Lebedew, Moskau.

(Eingegangen am 21. April 1910.)

In der oben genannten Arbeit schreibt der Verfasser[2]): „Lebedew hat die Wirkung von Elektrizität auf Enzyme studiert. Er hat Wechselströme benutzt; er hat auch einige Untersuchungen mit Gleichstrom angestellt, aber er hat Energien benutzt, die für diese Untersuchungen geradezu furchtbar sind, und es kann nicht wundernehmen, daß er gefunden hat, daß das Ferment stark geschädigt war."

Die schädigende Wirkung des starken Stromes (8 Amp.) auf die Diastase wurde von mir selbst betont[3]); wenn aber der Verfasser auch meinen Versuchen mit Wechselströmen denselben Vorwurf macht, so möchte ich erwidern, daß ich mit Strömen von fast derselben Intensität (0,013 bis 0,023 Amp.)[4]) wie Iscovesco (0,019 Amp.)[5]) gearbeitet habe, allerdings war die Spannung bei meinen Versuchen höher.

Nun behauptet Iscovesco, daß eben die Spannung an und für für sich schon eine vernichtende Wirkung auf die Enzyme ausübt. Daß diese Behauptung ganz willkürlich ist, kann man aus der folgenden Gegenüberstellung der 2 Tabellen leicht ersehen.

Die Tabelle A (links) stellt in Joule (nach Iscovesco sollen es Watt sein) die von ihm in 12 Versuchen angewandten Energiemengen dar. Die Kurven der Wirkung der Katalase, die dem Strom ausgesetzt war, stimmen im großen und ganzen mit diesen Zahlen überein. Daraus zieht der Autor den Schluß, daß nicht die Stärke des Stromes allein, sondern die ganze angewandte Energiemenge bei der Einwirkung des Stromes auf die Enzyme ausschlaggebend sei.

---

[1]) Diese Zeitschr. 24, 53, 1910.

[2]) l. c., S. 60.

[3]) Diese Zeitschr. 9, 391, 1908.

[4]) l. c., S. 394 bis 395.

[5]) l. c., S. 63.

Rechts die Tabelle B enthält die Umrechnung in Ampèrestunden.

Figur	Tabelle A (in Joule)	Tabelle B (in Ampèrestunden)
2	898,56	0,4160
3	279,41	0,1848
4	6,91	0,0030
5	1209,60	0,6720
6	168,78	0,0552
7	9,33	0,0036
8	5,18	0,0048
9	0,54	0,0005
10	190,96	0,0660
11	142,56	0,0660
12	22,44	0,0136
13	42,21	0,0259

Vergleicht man die entsprechenden Zahlen der beiden Tabellen mit dem Verlauf der oben genannten Kurven, so fällt die viel bessere Übereinstimmung der Zahlen der Tabelle B auf. Besonders in diesem Sinne sind die Versuche 7 und 8 bezeichnend, deren Kurven gerade nach den von mir ausgerechneten Zahlen und nicht nach denen des Autors verlaufen.

Demzufolge darf man noch mit größerer Berechtigung sagen, daß nicht die Spannung, sondern die Dauer und die Stärke des Stromes wichtig sind, wenn man die vernichtende Wirkung des Stromes auf die Enzyme selbst vermeiden will. Nun dauerten meine Versuche nicht länger als 3, die von Iscovesco bis 48 Stunden! Dazu kommt noch, daß gerade die Katalase für solche lange dauernden Versuche ihrer großen Empfindlichkeit wegen nicht geeignet ist.

Die Versuchsanordnung des Verfassers bietet dafür keine Garantie, daß die Nebenwirkungen des Gleichstromes ausgeschaltet sind, da die Kontrolle der Reaktion des Mediums (sauer oder alkalisch) noch keine genügende Bürgschaft gibt, daß die Wirkung der die Elektrolyse begleitenden und eventuell die Katalase schädigenden Nebenreaktionen[1]) aufgehoben ist.

Gerade um diese Elektrodenwirkungen zu vermeiden, habe ich die Wechselströme und bei Versuchen im sauren Medium (l. c., S. 402) diese in Verbindung mit Normalelektroden[2]) angewandt.

Was die übrigen Versuche von Iscovesco betrifft, so darf man überhaupt keinen großen Wert auf die kataphoretischen Versuche mit Enzymen in „physiologischen Flüssigkeiten" legen, wenn man bedenkt, wie stark der Sinn der Wanderung von Teilchen lyophiler Solen (wie es die Enzyme höchst wahrscheinlich sind) von der Reaktion des Dispersionsmittel abhängt. Infolgedessen können auch die Ergebnisse von solchen kataphoretischen Versuchen, so verlockend sie erscheinen, keinen nur einigermaßen zuverlässigen Aufschluß über die chemische Natur der Enzyme liefern.

[1]) Nur bei dieser Auffassung wäre es erklärlich, daß der Strom die Enzyme zum Teil zu vernichten vermag; ganz anders aber liegen die Verhältnisse, wenn man einen Einfluß des Stromes auf die Enzymwirkung annimmt.

[2]) Sotén, Wied. Ann. 47, 46, 1892.

Untersuchungen über Cholesterinausscheidung in menschlichen Gallen.

Von

Bacmeister.

(Aus der medizinischen Klinik Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 21. April 1910.)

Die Cholesterinausscheidung in der Galle ist schon häufig zum Gegenstand von Untersuchungen gemacht worden. Man hat die Galle von Tieren mit künstlich angelegten Fisteln und die relativ seltenen Fälle von Gallenfisteln beim Menschen auf ihren Cholesteringehalt geprüft und den Prozentualwert der Galle und ihrer Trockenbestandteile in vielen Fällen festgelegt.[1]) Auch für die pathologische Physiologie hat die Cholesterinausscheidung in der Galle das Interesse des Forschers erregt, weil das Cholesterin bei weitem den Hauptbestandteil aller Gallensteine, mögen sie entzündlicher oder nicht entzündlicher Natur sein, bildet. In den Vordergrund trat hier natürlich die Frage, ob durch Stoffwechselvorgänge oder geeignet gestaltete Diät die Cholesterinausscheidung beeinflußt werden könne. Naunyn hat in seiner früheren Straßburger Klinik zahlreiche Untersuchungen über diesen Punkt an Tieren mit Gallenblasenfisteln anstellen lassen. Thomas[2]), Kausch[3]) und Jankau[4]) kamen dabei zu dem Schluß, daß die Cholesterinausscheidung durch die Nah-

[1]) Brand, Beitrag zur Kenntnis der menschlichen Galle. Arch. f. Physiol. 90, 1902.

[2]) Über die Abhängigkeit der Absonderung und Zusammensetzung der Galle von der Nahrung. Diss., Straßburg 1890.

[3]) Über den Gehalt der Leber und der Galle an Cholesterin. Diss., Straßburg 1891.

[4]) Über Cholesterin- und Kalkausscheidung in der Galle. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmokol. 39.

rung in keiner Weise quantitativ zu beeinflussen sei, ebensowenig wie direkte Cholesterineinführung in den Organismus zu einem Plus in der Galle führte. Naunyn[1]) zog aus diesen Resultaten die Konsequenz, daß das Cholesterin deshalb überhaupt kein von der Leberzelle ausgeschiedenes Stoffwechselprodukt sei, sondern er verlegte seinen Geburtsort in die Epithelien der Gallenblase und der Gallengänge. Dem gegenüber haben sich in der letzten Zeit Stimmen geltend gemacht, die an dieser Unabhängigkeit der Cholesterinausscheidung von Stoffwechselvorgängen zweifelten. Goodmann[2]) konnte bei Hunden mit Gallenblasenfisteln zeigen, daß bei eiweißreicher Nahrung das Cholesterin in der 24stündigen Gallenmenge anstieg, daß dies aber besonders dann der Fall war, wenn er rote Blutkörperchen verfütterte. Kusumoto[3]) stellte fest, daß bei Applikation von Giften, die zu einem starken Zerfall roter Blutkörperchen führen, eine Vermehrung des Gallencholesterins bei Hunden auftritt.

Untersuchungen beim Menschen über die Cholesterintagesausscheidung sind bisher nicht angestellt, jedenfalls habe ich in der Literatur nichts darüber finden können. Der Grund ist leicht einzusehen. Es ist sehr schwierig, beim Menschen die wirklich volle Tagesmenge der Galle zu erhalten. Auch in den relativ seltenen Fällen von spontanen oder postoperativen Gallenblasenfisteln, die untersucht werden konnten, fand gewöhnlich ein Teil der Galle seinen Weg doch noch durch den Ductus Choledochus in den Darm, so daß man fast stets auf Darstellung der absoluten Tagesmenge verzichten und sich mit dem Prozentualgehalt der gewonnenen Galle begnügen mußte. Eine Übertragung der bei Tieren gewonnenen Erfahrungen auf den Menschen ist aber mit großer Vorsicht aufzunehmen, da schon bei den Tieren untereinander — je nach ihrer Nahrungsweise — die Galle ganz verschieden komponiert ist.

In der letzten Zeit habe ich Gelegenheit gehabt, in 4 Fällen die menschliche Galle auf ihre Tages-Cholesterinausscheidung zu untersuchen. Die ersten 3 Fälle kamen in der Bonner chirurgischen Klinik zur Beobachtung, und die Zuweisung des Materials verdanke ich meinem früheren Chef, Herrn Geheimrat

[1]) Klinik der Cholelithiasis, 1892.
[2]) Beiträge z. chem. Physiol. 9, 1907.
[3]) Diese Zeitschr. 14, 5 und 6, 1908.

Garré. Im ersten Fall handelte es sich um eine Gallenblasenfistel bei einer 56jährigen Frau, die nach Incision eines Gallenblasenempyems 2 Monate nach der Operation in die Klinik kam. Wie sich später herausstellte, war der Ductus Choledochus durch ein Pankreascarcinom völlig verschlossen, so daß bei ganz acholischen Stühlen die gesamte Galle nach außen entleert wurde. Die beiden nächsten Fälle waren wegen Cholelithiasis und Choledochussteinen zur Operation gekommen. An die Operation wurde die Hepaticusdrainage angeschlossen, und während einer längeren Zeit floß die gesamte Galle aus dem Drain ab und konnte aufgefangen werden.

Die Bestimmung der ausgeschiedenen Cholesterintagesmenge wurde nach der von Windaus[1]) kürzlich angegebenen Digitoninmethode ausgeführt. Es wurde jedesmal die 24stündige Menge aufgefangen, die Galle auf dem Wasserbade eingetrocknet, der Rückstand gepulvert und mit heißem Äther völlig extrahiert, der Äther verdampft und der Rest wieder mit Alkohol aufgenommen. Das in Alkohol gelöste Cholesterin wurde dann mit Digitonin ausgefällt, aus dem gewaschenen und getrockneten Filterrückstand mittels der Windausschen Formel die ausgeschiedene Tagesmenge berechnet. Bei diesem chemischen Teil der Untersuchungen hat Herr Professor Windaus selbst mich auf das liebenswürdigste unterstützt; ihm verdanke ich auch einen Teil des zurzeit überhaupt nicht mehr zu erhaltenden Digitonins.

Auf die Resultate der Untersuchungen möchte ich nun eingehen. Im 1. Fall, der postoperativen Gallenblasenfistel bei völligem Verschluß des Ductus Choledochus durch einen Tumor, konnte 3mal die 24stündige Gallenmenge in aufeinander folgenden Tagen in einwandfreier Weise aufgefangen werden. Die produzierte Gallenmenge schwankte zwischen 830 und 940 ccm, die ausgeschiedene Cholesterintagesmenge wird durch die in der Tabelle vermerkten Zahlen angegeben, ebenso wie der auf die Gallenmenge berechnete Prozentualgehalt. Die Durchschnittsmenge betrug 0,23 g. Von Interesse sind die ziemlich starken Schwankungen in der Tagesmenge. Am 2. und 3. Tag wurde fast das Doppelte ausgeschieden wie am 1.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 238, 1909.

Tabelle.

	Tag 1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	Durchschnittsausscheidung von Cholesterin	Durchschnitts-Prozentualgehalt
1. Gallenmenge	940	800	900	830											0,23	0,024
Cholesterin		0,15	0,29	0,26												
Prozentgehalt		0,018	0,032	0,032												
2. Gallenmenge	280	200	360	400	340	370	370	320	350	320	350	375	375	360	0,17	0,039
Cholesterin	0,023	0,0078		0,22		0,144	0,11	0,11	0,18	0,36	0,19	0,21	0,19	0,24	(0,2)	(0,045)
Prozentgehalt	0,0082	0,0039		0,054		0,039	0,027	0,034	0,051	0,11	0,059	0,06	0,051	0,067		
3. Gallenmenge	160	180	190	200	170	130	260	260	240	300	260	100	150		0,11	0,05
Cholesterin	0,007	0,073	0,024	0,12	0,044	0,048	0,14	0,14	0,086	0,29	0,18	0,069	0,13		(0,13)	(0,059)
Prozentgehalt	0,0043	0,041	0,013	0,06	0,026	0,037	0,054	0,054	0,036	0,097	0,069	0,069	0,089			
4. Gallenmenge			405		290	430	56								0,21	0,059
Cholesterin			0,12		0,17	0,21	0,053 (0,32 ?)								2. und 3. in Tagen nach d.	denselben Operation
Prozentgehalt			0,029		0,059	0,049	0,093								0,16	0,04
															0,075	0,038

Auf den Versuch, hier durch verschieden geregelte Diät die Ausscheidung zu beeinflussen, gehe ich nicht ein, da die Untersuchungsreihe viel zu kurz ist, um irgendwelche Schlüsse daraus zu ziehen.

Dagegen konnte im 2. Falle 12 mal die 24stündige Gallenmenge untersucht werden. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle. In der 1. Reihe findet man die aufgefangenen Gallenmengen, darunter die ausgeschiedene Cholesterinmenge, und zuletzt den prozentualen Gehalt der Galle an Cholesterin. Was zunächst in die Augen springt, ist die außerordentlich geringe Menge an Cholesterin, die in den ersten Tagen nach der Operation ausgeschieden wurde, es handelt sich in den ersten beiden Tagen um 0,023 und 0,0078 g, während der Durchschnittswert der ganzen Reihe 0,17 oder, nach Abzug dieser bei-

den abnorm tiefen Werte, sogar 0,2 ist. Dieser geringen Cholesterinmenge entspricht aber nicht eine ebenso stark herabgesetzte Gallenmenge, sondern diese ist nur relativ wenig vermindert. In den folgenden Tagen steigt dann, während die Gallenmenge sich nur wenig erhöht, die Cholesterintagesmenge sehr erheblich an, dabei bleiben aber auffallend große Schwankungen in den einzelnen Werten bestehen. An einem Tage (10.) wurde fast das Doppelte des Mittelwertes — 0,36 — festgestellt. Ich habe zwar versucht, dem Kranken eine bestimmte Kostordnung zu geben, bei der an den einzelnen Tagen Eiweiß, Fette oder Kohlenhydrate vorherrschten, doch war diese Ordnung bei dem Operierten nur unvollkommen durchzuführen; ein bestimmter Einfluß auf die Ausscheidungskurve läßt sich nicht erkennen, speziell unterschied sich die Nahrung, die der großen Ausscheidung am 10. Tag entsprach, nicht wesentlich von der vorhergehenden. Zu bemerken ist noch, daß die Temperatur während des ganzen Verlaufes unter 37,3° war und keine großen Schwankungen zeigte.

Günstiger lag der 3. Fall, dessen Resultate ebenfalls in der Tabelle angegeben sind. Auch hier wieder die starke Herabsetzung der Cholesterintagesmenge nach der Operation, ohne daß die Gallenmenge in gleicher Weise vermindert war. Der tiefste Punkt 0,0073 g gegen 0,11 Durchschnittswert (0,13 nach Abzug der ersten 3 Tage nach der Operation) lag wieder am 1. Tage post operationem, dann findet staffelförmiges Ansteigen mit erheblichen Schwankungen statt. In diesem Falle konnte die wechselnde Diät etwas intensiver gestaltet werden. Da zeigte sich dann regelmäßig, daß jedesmal, wenn wir größere Ausscheidungen hatten, die Nahrung erheblich eiweißreicher als an den vorhergehenden Tagen war (4., 7., 10. Tag), während stets ein Abfall erfolgte, wenn in der Hauptsache Kohlenhydrate gereicht wurden (5., 9., 12. Tag). Ganz erklärt werden die erheblichen Schwankungen in der Cholesterintagesmenge durch die Art der Nahrung allerdings nicht, denn an einem Tage (10.), an dem weit über das Doppelte der Durchschnittsmenge sich in der Galle fand, war die gereichte Kost zwar erheblich eiweißreicher als an den Tagen des Tiefstandes, unterschied sich aber nicht so wesentlich von den anderen Tagen des Hochstandes, um diesen intensiven Ausschlag zu erklären. Vielleicht liegt der Grund

darin, daß, wie Goodmann meint, die eiweißreiche Nahrung nur einen stärkeren sekretorischen Reiz auf die Leberzelle ausübt, der in verschiedener Intensität zur Anwendung kommt; wahrscheinlich kommt bei diesen pathologischen Verhältnissen aber noch ein anderer endogener Faktor in Frage, der sich noch nicht bestimmen läßt.

Zuletzt hatte ich Gelegenheit, einen 4. Fall zu untersuchen, den ich der Liebenswürdigkeit der hiesigen chirurgischen Kollegen verdanke. Es war wieder ein Fall von Cholelithiasis und Choledochussteinen, bei dem im Anschluß an die Operation die Hepaticusdrainage ausgeführt war. Was den Fall besonders interessant macht, ist der Umstand, daß der 48jährige Mann Diabetiker war und in der Zeit nach der Operation 1,5 bis 2,5% Zucker im Urin ausschied. Auch in diesem Falle erfolgte bei ziemlich gleichmäßiger Nahrung wieder ein erheblicher Anstieg der Cholesterintagesmenge in der Galle, je weiter wir uns von der Operation entfernen. Nur wurden hier erheblich größere Mengen ausgeschieden als in den vorher besprochenen Fällen. Am 5. Tage konnten, da ein Teil der Galle am Drain vorbei in den Verband floß, von der gesamten Menge nur 56 ccm aufgefangen werden, aber diese enthielten schon 0,053 g Cholesterin. Es floß aber während des ganzen Tages etwas Galle durch das Drain ab, so daß der Prozentualgehalt der Galle doch einen Rückschluß auf die Tagesmenge gibt, die auf die Durchschnittsgallenmenge dieses Falles berechnet an diesem Tage sich auf 0,32 stellen dürfte. Wir haben also in diesen Tagen eine Durchschnittsausscheidung von 0,21 g Cholesterin vor uns, während in den vorhergehenden Fällen in denselben Tagen nach der Operation nur 0,16 resp. nur 0,075 ausgeschieden wurden.

Ich will die Ergebnisse dieser Untersuchungen nicht verallgemeinern, dazu sind sie zu gering an Zahl und die Ausschläge sind zu vieldeutig. Hervorzugehen scheint mir aber aus den gewonnenen Zahlen, daß erstens die ausgeschiedene Tagesmenge des Cholesterins in der menschlichen Galle starken Schwankungen unterworfen ist. Entsprechend den Versuchen Goodmanns am Tier scheint nach dem 3. Falle auch beim Menschen die Cholesterinausscheidung bei verstärkter Eiweißzufuhr zu steigen, bei Kohlenhydratnahrung zu fallen. Auffallend ist in den drei letzten Fällen die starke Herabsetzung des

Cholesterins in den ersten Tagen nach der Operation im Gegensatz zu der produzierten Gallenmenge. In erster Linie scheint mir hier an die Narkose gedacht werden zu müssen, welche die Leberzelle selbst in direkter oder indirekter Weise in ihrer Sekretionsfähigkeit hemmt; kombiniert wird diese Narkosenwirkung natürlich durch das Daniederliegen aller Körperfunktionen und des gesamten Stoffwechsels nach dem schweren Eingriff. Ein solcher endogener Faktor spricht sicher auch bei der Steigerung der Ausscheidung mit, da die zum Teil gewaltigen späteren Schwankungen sich nicht allein durch die verschiedene Nahrungsform erklären lassen.

Gewiß handelt es sich in allen diesen Fällen um pathologische Verhältnisse, so fällt ja die Resorption der Gallenbestandteile von der Darmwand völlig aus, und die Gallenwege waren stets entzündlich verändert; es lag mir auch nicht daran, physiologische Werte aufzustellen, aber gerade ganz ähnliche Verhältnisse sind es, die bei der überwiegenden Zahl der Gallensteinbildung das Bild beherrschen, und deshalb scheinen mir die gewonnenen Werte trotz ihrer geringen Zahl wertvoll für die Frage nach der Herkunft der Hauptkomponente der Gallensteine zu sein. Gerade das regelmäßige Absinken der Cholesterinmenge nach der Operation scheint mir ebenso wie die gewisse Abhängigkeit von der Nahrung ein Beweis zu sein, daß das Cholesterin als ein Produkt des allgemeinen Stoffwechsels durch die Leberzelle ausgeschieden wird. Bestände die Ansicht Naunyns zu Recht, die das Cholesterin aus dem desquamierenden Katarrh der Gallenwege, aus gesteigertem Zellzerfall herleitet, so müßte gerade nach der Operation, wo die entzündeten Gallenwege, es handelt sich hier stets um Choledochussteine, zunächst durch die mechanischen Insulte erheblich gereizt werden, eine stärkere Ausscheidung erfolgen, die dann mit Ausheilung der entzündlichen Prozesse zurückgehen müßte; genau das Gegenteil ist aber in allen 3 Fällen eingetreten. Die stark erhöhte Ausscheidung, die in dem Fall von Diabetes eintrat, ist ebenfalls sehr bemerkenswert und geeignet, die Abhängigkeit der Cholesterinausscheidung von Stoffwechselerkrankungen nahe zu legen.

Die endgültige Feststellung dieser Tatsache, zu der diese beim Menschen erhobenen Befunde m. E. einen weiteren Bau-

stein liefern, die aber, wenn die chemischen Fabriken das zurzeit völlig vergriffene Digitonin wieder liefern können, jetzt am Tier weiter verfolgt werden sollen, hat auch eine praktische klinische Bedeutung. Da wir jetzt wissen, daß in einer sehr großen Zahl von Fällen der Cholelithiasis sich zunächst ein reiner Cholesterinstein bildet, der dann erst seinerseits oft das entzündliche Gallensteinleiden nach sich zieht, so würde durch die Möglichkeit, die Cholesterinausscheidung in der Galle durch die Diät herabsetzen zu können, der internen Medizin in der Prophylaxe und zur Verhinderung des Weiterwachsens schon bestehender Steine ein erheblich größeres Feld eingeräumt werden müssen, als es augenblicklich der Fall ist.

Zur Kenntnis der Zuckerspaltungen.

Von

Walther Löb.

Nachtrag.

Über die Zuckersynthese aus Formaldehyd.

Von

Walther Löb und Georg Pulvermacher.

(Aus der chemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 25. April 1910.)

In der vorliegenden Mitteilung bringen wir die in der VII. Mitteilung[1]) angekündigten Versuche über die Kondensation des Formaldehyds unter der Einwirkung von Bleihydroxyd. Derartige Versuche sind bekanntlich bereits früher von Lobry de Bruyn und van Eckenstein[2]) ausgeführt worden. Uns interessierte vornehmlich die Frage, ob die Spaltung in eine Pentose und das Auftreten der bei der Zuckerspaltung beobachteten Polyoxysäuren auch hier konstatiert werden kann. Die weitere Frage, ob der Formaldehyd nur bis zu einem Gleichgewicht zwischen Zucker, Pentose und Formaldehyd verbraucht werden würde, oder ob hier die Reaktion zu einem andern Gleichgewicht führt, haben wir gleichfalls berücksichtigt. Es zeigte sich, daß unter unsern Versuchsbedingungen bei den Aufbaureaktionen aus Formaldehyd im allgemeinen das Gleichgewicht bei Verbindungen mit einer geringeren Kohlenstoffzahl erreicht ist, als bei den Abbaureaktionen des Zuckers. Das ist auch verständlich, wenn man bedenkt, daß bei den Synthesen aus Formaldehyd ein einigermaßen beständiger Zustand der niederen Glieder zu einem an diesen reichen Endsystem führen muß, während bei den Zuckerspaltungen, d. h.

[1]) Diese Zeitschr. 23, 10, 1909.

[2]) Recueil des travaux chimiques des Pays Bas 18, 309.

bei dem allmählichen Abbau eines kohlenstoffreicheren Komplexes, ebenso die Möglichkeit besteht, daß das System bereits bei kohlenstoffreicheren Verbindungen relativen Bestand besitzt. Obgleich also Zuckeraufbau aus Formaldehyd und Zuckerspaltung aus Traubenzucker umkehrbare Reaktionen sind,[1]) ist es durchaus möglich, daß das experimentell erhältliche Gleichgewicht nicht identisch wird, weil sich bei dem Aufbau aus Formaldehyd in den niederen Gliedern, bei dem Abbau des Zuckers in den höheren Gliedern Hemmungen der Reaktionsgeschwindigkeit zeigen, die einen scheinbaren, aber recht beständigen Gleichgewichtszustand herbeiführen.

Ferner gelang es uns nicht, bei länger dauernden Versuchen den Formaldehyd, der sich durch die empfindlichen Reaktionen bereits in sehr geringer Menge nachweisen läßt, mit Sicherheit zu konstatieren. Wohl aber trat relativ reichlich Methylalkohol und Acrolein auf, welch letzteres bei den Zuckerspaltungen nicht beobachtet wurde. Die Bildung des Methylalkohols erklärt wohl zur Genüge das vollständige Schwinden des Formaldehyds. Ist diese Deutung richtig, so ist der Formaldehyd aus dem Zuckergleichgewichtszustand nicht durch Verschiebung desselben verschwunden, sondern nur durch das Eingreifen einer andern Reaktion, der Umsetzung des Formaldehyds zu Ameisensäure und Methylalkohol, die mit der eigentlichen Zuckerspaltung überhaupt nichts zu tun hat.[2]) Daß bei den Zuckerspaltungsversuchen der Methylalkohol nicht nachweisbar auftritt, rührt von der geringen Menge Formaldehyd bei diesen Reaktionen her.

Wir enthalten uns auch hier vorläufig einer theoretischen Formulierung der Entstehung des Acroleins, das zweifellos mit dem Auftreten der Säure mit drei Kohlenstoffatomen in nahem Zusammenhang steht. Nur das eine sei erwähnt, daß das Acrolein voraussichtlich erst ein Zersetzungsprodukt des zu Glycerinaldehyd oder Dioxyaceton polymerisierten Formaldehyds ist, wobei vielleicht durch gegenseitige Oxydation und Reduktion zweier Glycerinaldehydmoleküle Glycerin und Glycerinsäure entstehen.

---

[1]) Vgl. die VII. Mitteilung. Diese Zeitschr. 23, 10, 1909.

[2]) Vgl. H. und A. Euler, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 39, 1906. — Löb, diese Zeitschr. 12, 78, 1908.

Einem gleichen Einfluß wie der Formaldehyd ist in diesen Versuchen eine Pentose nicht unterworfen. In der Tat können wir die früheren Beobachtungen und Angaben von Fischer[1]), Neuberg[2]) und Euler[3]) über das Auftreten der Pentosenreaktionen bestätigen, wenn es uns auch nicht gelang, eine Pentose in der Form eines reinen Osazons zu isolieren. Der Grund für das Mißlingen der Reindarstellung des letzteren liegt in dem Auftreten von anderen wasserlöslichen Osazonen, wie des Acrosazons (Schmelzpunkt 179°) und wahrscheinlich auch des Glycerosazons. Hingegen konnten wir außer den qualitativen Reaktionen nach dem Verfahren von Tollens die Menge der auftretenden Pentose auch quantitativ feststellen.

Da bekanntlich bei der Einwirkung von Bleihydroxyd auf Formaldehyd eine Hexose entsteht, so waren auch die Produkte einer Zuckerspaltung, freilich in geringerer Ausbeute als bei der Wahl des Traubenzuckers als Ausgangsmaterie, zu erwarten. So tritt verhältnismäßig reichlich Zuckersäure neben Säuren mit niedrigerem Kohlenstoffgehalt und Ameisensäure auf.

Dem Nachweis, daß tatsächlich Zuckersäure und nicht Glycerinsäure, deren Calciumgehalt dem des zuckersauren Salzes gleich ist, gebildet wird — eine Frage, die in der letzten Mitteilung als eine noch offene hingestellt wurde — haben wir besondere Versuche gewidmet, die mit Sicherheit zu gunsten der Zuckersäure entschieden haben.

Ein vollständig klarer Einblick in die bei der Reaktion herrschenden Verhältnisse ist nur schwer zu erhalten, weil in jedem Augenblick das System ein anderes geworden ist und stets von neuem der Einwirkung des nur langsam verbrauchten Bleihydroxydes unterliegt.

Im wesentlichen können wir bei den Dauerversuchen zwei Hauptsysteme der Reaktion unterscheiden. Das eine ist das der Synthese unterworfene, das zur Hexose und zur Pentose führt. Wenn Formaldehyd als Teil eines Gleichgewichts mit der letztgenannten Zuckerart auftritt, so wird er wieder durch die Hydroxylionen der Lösung in Ameisensäure und Methyl-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 988, 1888; 22, 359, 1889.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 2632, 1902.
[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 45, 1906.

alkohol gespalten. Das zweite System betrifft die Spaltung der entstandenen höheren Zucker und ist mit dem in den früheren Mitteilungen behandelten im Prinzip identisch.

Experimenteller Teil.

150 ccm 40%ige Formaldehydlösung wurden mit 12 g Bleihydroxyd und 1500 ccm Wasser 73 Stunden in einer verschlossenen Glasflasche bei 70° im Thermostaten digeriert. Nach dieser Zeit ist der Geruch nach Formaldehyd verschwunden, der nach Methylalkohol und Acrolein deutlich vorhanden. Die Lösung war dunkel geworden und enthielt ein braungelbes, unlösliches Bleisalz. Das Gewicht des letzteren nach Filtration, Waschen und Trocknen betrug 0,5 g. Es wurde in Wasser suspendiert und durch Schwefelwasserstoff vom Blei befreit. Das Filtrat, nach Vertreiben des überschüssigen Schwefelwasserstoffs durch einen Luftstrom, bei 50° im Vakuum destilliert, gab im Destillat nur 0,004 g Ameisensäure, das als Bariumsalz durch bekannte Reaktionen identifiziert wurde. Der Destillationsrückstand, in heißem Wasser gelöst, durch Calciumcarbonat in das Kalksalz übergeführt, ließ sich mit Tierkohle entfärben und lieferte mit Alkohol ein Kalksalz in geringer Menge, dessen Calciumgehalt, 26,6%, dem des tartronsauren Calciums (Ca = 25,31%) nahe kam.

Das Filtrat des ursprünglichen Bleisalzes wurde durch verdünnte Schwefelsäure vom Blei befreit. Nach abermaliger Filtration neutralisierten wir mit Calciumcarbonat und destillierten die klar filtrierte Lösung der Calciumsalze unter Anwendung eines Rektifikationsaufsatzes über freiem Feuer, bis die Menge des Destillats 100 ccm betrug.

Das Destillat mit deutlichem Geruch nach Methylalkohol gab keine Reaktion auf Formaldehyd, hingegen deutliche Reduktion einer ammoniakalischen Silberlösung unter Bildung eines Silberspiegels und Gelbfärbung beim Kochen mit Resorcin und 50%iger Natronlauge. Diese Reaktionen sprechen für das Auftreten von Acrolein. Um seinen Nachweis sicher zu stellen, oxydierten wir 75 ccm des Destillats mit frisch gefälltem Silberoxyd, wobei gleichfalls Bildung eines Silberspiegels auftrat. Nach Zusatz von Soda bis zur alkalischen Reaktion wurde filtriert und, um gleichzeitig den Methylalkohol abzutrennen, die alka-

lische Lösung destilliert. Das Destillat gab bei der Behandlung mit Benzoylchlorid und Natronlauge den Benzoesäuremethylester.

Der Destillationsrückstand wurde eingeengt, mit Schwefelsäure angesäuert und abermals destilliert. Das saure Destillat lieferte nach der Behandlung mit frisch gefälltem Bleicarbonat die charakteristischen Nadeln von acrylsaurem Blei.

Das ursprüngliche, mit Calciumcarbonat neutralisierte Filtrat, aus dem der Methylalkohol und das Acrolein abdestilliert waren, wurde weiter mit Wasserdampf destilliert. Auch jetzt konnten wir im Destillat keine Reaktion auf Formaldehyd erhalten. Hingegen trat bei der Behandlung mit Natronlauge und Wasserstoffperoxyd noch Acrylsäure auf; daneben in äußerst geringer Menge Ameisensäure. Doch war die Reaktion so schwach, daß ihre Entstehung aus Formaldehyd nicht mit Sicherheit behauptet werden darf.

Die mit Wasserdampf behandelte Lösung, eine braune Flüssigkeit, enthielt nunmehr noch Zucker und Kalksalze höherer Säuren. Sie wurde bei 50° im Vakuum zur Trockne gebracht und der Rückstand mit 500 ccm absolutem Alkohol, dann mit 250 ccm 90%igem Alkohol und schließlich 3 mal mit je 250 ccm absolutem Alkohol ausgekocht. Die vereinten Filtrate gaben im Vakuum 30,5 g Trockensirup, der nur 4%, d. h. 1,2 g vergärbaren Zucker enthielt. Bei Überführung in die Osazone beobachteten wir dieselben Schwierigkeiten, die bereits die oben erwähnten Forscher beschrieben haben. Durch Krystallisation aus heißem Wasser gelang es schließlich, ein Osazon zu isolieren, das unscharf bei 134° schmolz. Dasselbe bestand aus einem in Ligroin löslichen und einem in diesem unlöslichen Anteil. Zur Trennung wurde das ursprüngliche trockene Osazon in wenig Chloroform gelöst und Ligroin hinzugefügt. Der gelbe Niederschlag zeigte den Schmelzpunkt 179° (Acrosazon?). Durch Verdunsten der Chloroform-Ligroinlösung resultierte ein Osazon vom Schmelzpunkt 152°. Wir versuchten bei der Schwierigkeit, aus den Osazonen Anhaltspunkte zu gewinnen, deshalb auf anderm Wege das Auftreten der Pentose sicherzustellen. Zu dem Zweck ließen wir 100 ccm der 10%igen Lösung des Zuckersirups mit Hefe vollständig vergären, fällten aus der vergorenen und filtrierten Lösung die aus der Hefe stammenden Eiweißprodukte mit kolloidaler Eisenoxydlösung

und dampften das klare Filtrat im Vakuum bei 50° ein. Der Rückstand, etwa 6 g, zur 10%igen wässerigen Lösung gebracht, zeigte ausgesprochen die Bialsche Reaktion und gab bei der Furfuroldestillation 5,54% Pentose. (25 ccm der Lösung gaben 0,1186 g Phloroglucid.) Die Herstellung der Osazone aus der vergorenen Lösung führte abermals nicht zu eindeutigen Resultaten. Wir erhielten Gemische, so daß die Angaben der Einzelheiten unterbleiben können.

Die in Alkohol unlöslichen Kalksalze enthielten noch ameisensaures Salz. Sie wurden deshalb mit Oxalsäure übersättigt und mit Wasserdampf behandelt, bis das Destillat neutral überging. Es lieferte noch 3,05 g Ameisensäure, die als Bariumsalz identifiziert wurde. Essigsäure war nicht entstanden. Der Destillationsrückstand der Wasserdampfbehandlung wurde wieder mit Calciumcarbonat neutralisiert, das Filtrat im Vakuum zur Trockne gebracht und der Rückstand durch Lösen in wenig Wasser mit Tierkohle entfärbt und durch Fällung mit Alkohol gereinigt. Wir erhielten 6,5 g trockenes Ca-Salz, das nach der Analyse vorwiegend aus zuckersaurem Ca bestand.

0,1978 g gaben 0,0472 g CaO = 17,04% Ca.

Ber. für zuckersaures Ca . . . . 16,16%.

Ein zweiter Versuch, der 170 Stunden durchgeführt wurde, gab qualitativ dieselben Produkte. Die quantitativ festgestellte Menge des Methylalkohols betrug 8 bis 9 g. Aus dem Destillat ließ sich der Alkohol durch Absättigung mit Kaliumcarbonat isolieren und direkt destillieren. Auch das Verhalten der Osazone war in diesem und mehreren anderen Versuchen das schon beschriebene, so daß wir bei der qualitativen Übereinstimmung der Beobachtungen auch bezüglich der anderen Produkte auf die Angabe der Einzelheiten verzichten können.

Über die Identifizierung der Zuckersäure.

Wir haben, da der Calciumgehalt eine Entscheidung zwischen Zuckersäure und Glycerinsäure nicht gestattet, verschiedene Versuche gemacht, die Natur der Säure durch ihre Reingewinnung sicherzustellen. Die Versuche blieben erfolglos. Auch der Weg über den Methylester der Säure erwies sich als nicht gangbar. Zwar gelang es durch Suspension des Calciumsalzes in absolutem Alkohol und Einleiten von trockenem Salz-

säuregas eine Flüssigkeit zu erhalten, aus der sich nach Zusatz von Wasser und vorsichtiger Neutralisation mit Calciumcarbonat in der Kälte ein Ester durch Chloroform ausschütteln ließ. Doch scheiterten alle Versuche, ihn zu reinigen. Wir haben deshalb aus der Lösung der Calciumsalze durch genaue Ausfällung des Calciums mit Oxalsäure die freie Säure dargestellt. Dieselbe, ein halbfester, dunkelbrauner Sirup, löste sich in Wasser, Alkohol und Aceton, war unlöslich in Äther, Chloroform, Benzol, Ligroin und Essigester. Durch Verreiben mit Aceton entstand eine dunkle Lösung, die nach ihrer Filtration von einer kleinen Menge eines unlöslichen Körpers mit wasserfreiem Äther eine graue feste Fällung lieferte. Lösung in Aceton und Fällung mit Äther wurden mehrfach wiederholt, wobei dafür Sorge zu tragen ist, daß beide Flüssigkeiten stark abgekühlt sind. Die feste Säure wurde schließlich als fast weißes Pulver erhalten, das stark hygroskopisch ist, an der Luft klebrig wird, Fehlingsche Lösung nicht reduziert, dagegen wohl eine ammoniakalische Silberlösung unter Spiegelbildung. Der Nachweis, daß tatsächlich Zuckersäure vorlag, ließ sich durch Herstellung des schwer löslichen sauren Kaliumsalzes erbringen. Zu dem Zwecke wurde die Säure in Wasser gelöst, die Hälfte der Lösung genau mit Kalilauge neutralisiert und zu der zweiten Hälfte der nicht neutralisierten Säurelösung gesetzt. Beim Einengen im Vakuumexsiccator trat eine zwar undeutliche Krystallisation des schwer löslichen Kaliumsalzes ein. Dasselbe wurde — nach dem Trocknen bei 100° und im Vakuumexsiccator bis zum konstanten Gewicht — mit Schwefelsäure verascht.

0,0504 g K-Salz gaben . . . . 0,0168 g K_2SO_4 = 14,96% K.

Ber. für saures, zuckersaures K: $C_6H_9O_8K$ = 15,76% K.

Zur Kenntnis der in Essigäther löslichen Stoffe tierischer Organe und ihres Verhaltens bei der Autolyse. I.

Von

Kenro Kondo.

Enthält die Leber Cholesterinester?

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 26. April 1910.)

Die Frage, ob in der Leber neben Cholesterin auch Cholesterinester enthalten sind, hatte Y. Nukada[1]) im hiesigen Laboratorium in der Weise zu entscheiden gesucht, daß er mittels der Acetylzahl die Menge der freien Hydroxylgruppen im Petrolätherextrakte bestimmte und sie verglich mit der Menge der Hydroxylgruppen im Fettsäuregemisch, das man aus dem Petrolätherextrakt durch Verseifen mit alkoholischer Kalilauge und Übersättigen mit Salz- oder Schwefelsäure erhält. Waren Cholesterinester vorhanden, so war zu erwarten, daß nach der Verseifung die Zahl der Hydroxylgruppen im Fettsäuregemisch zunahm. J. Nukada fand, daß die Acetylzahl des Fettsäuregemisches nicht zunahm, und schloß hieraus, daß die Leber keine nachweisbaren Mengen von Cholesterinester enthielt.

Beobachtungen, die ich im Verlaufe der später mitzuteilenden Versuche machte, ließen in mir Zweifel nicht an der Richtigkeit der Beobachtungen Nukadas, wohl aber an der Richtigkeit seines Schlusses entstehen. Ich wiederholte unter Leitung von Prof. F. Röhmann die Versuche Nukadas, nur mit dem Unterschied, daß ich die Acetylzahl nicht im Petrol-

[1]) Diese Zeitschr. 14, 419, 1908.

ätherextrakt, sondern im Essigätherextrakt der Leber vor und nach der Verseifung bestimmte. Der Essigäther läßt eine beträchtliche Menge Stoffe (Lecithine u. a.) ungelöst, die sich in Petroläther lösen.

Die Methode der Untersuchung.

Die Leber wurde in der Fleischmaschine gemahlen und eine abgewogene Menge sofort mit der zweifachen Menge 94%igen Alkohols gefällt, auf dem Wasserbade bis zum Sieden erhitzt und auf der Nutsche abgesaugt; dann wurde noch zweimal in derselben Weise mit Alkohol ausgekocht. Die so erhaltenen drei Extrakte wurden vereinigt, bei vermindertem Drucke und kleiner Flamme im Wasserbade auf ein möglichst kleines Volumen und dann in flacher Schale bis zum dünnen Sirup eingeengt. Das Schäumen beim Einengen ist durch Bimssteinstückchen ganz gut zu verhindern. Der bräunliche zähe Rückstand wurde in 60 bis 80 ccm Essigäther unter Erhitzen auf dem Wasserbade gelöst und etwa 12 Stunden stehen gelassen und filtriert.

Das ungelöst Bleibende wurde sechsmal mit 20 bis 30 ccm Essigäther behandelt, indem man dabei jedesmal auf dem Wasserbade bis zum Sieden erhitzte und nach dem Erkalten filtrierte. Der Gesamtessigätherextrakt wurde in einen vorher genau gewogenen Erlenmeyer-Kolben gegossen. Der Essigäther wurde auf einem geschützten Wasserbade vollständig abdestilliert und der Rückstand im Leuchtgasstrome auf gelind erwärmtem Wasserbade bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Meist genügte hierzu 1 Stunde. Der trockene Essigätherextrakt wurde in zwei Teile geteilt.

Ein Teil des Essigätherextraktes wurde gewogen und mit etwa 3 Teilen Essigsäureanhydrid acetyliert. Die acetylierte Masse wurde mit etwa 200 ccm 10%iger Kochsalzlösung versetzt, etwa 1 Stunde auf dem Wasserbade erwärmt und stehen gelassen. Nach 12 bis 24 Stunden war die unten stehende Flüssigkeit klar. Sie wurde durch ein doppeltes Filter abfiltriert, das aus einem kleineren Filter aus gehärtetem und einem größeren Filter aus gewöhnlichem Filtrierpapier bestand. Der Filterrückstand wurde zuerst mit gelinde erwärmter Kochsalzlösung gewaschen, bis sich das Filtrat fast säurefrei zeigte; dann wurde noch einigemal ziemlich heiße Kochsalzlösung aufgegossen. Hierauf ließ ich den Rückstand an der Luft trocknen, dann wurde er in Äther gelöst und die ätherische Lösung noch einmal mit wenig destilliertem Wasser ganz leise geschüttelt und stehen gelassen, bis die Wasserschicht klar wurde. Der Äther wurde nunmehr abdestilliert und der Rückstand mit alkoholischer Kalilauge verseift. Die Seifen wurden in einer Porzellanschale zur Entfernung des Alkohols mit Wasser auf dem Wasserbade wiederholt abgedampft, dann wurden die Seifen mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt. Die hierbei frei werdende Essigsäure wurde in der von Nukada beschriebenen Weise abdestilliert und ihre Menge durch Titration mit etwa $^n/_{10}$-Kalilauge bestimmt.

Ein anderer Teil des Essigätherextraktes wurde gewogen und mit $^n/_2$ alkoholischer Kalilauge verseift. Der Überschuß des Alkalis wurde nach Zusatz von Phenolphthalein mit $^n/_2$-Salzsäurelösung zurücktitriert; dann wurde nach Abdestillieren des Alkohols mit Wasser verdünnt und Salzsäure zugesetzt, bis die Lösung blaues Lackmoidpapier stark rötete, und erwärmt, bis sich das Gemisch von Fettsäuren und Cholesterin gut abgeschieden hatte. Es wurde heiß filtriert und mit warmer 10%iger Kochsalzlösung säurefrei gewaschen.

Der Rückstand wurde auf dem Filter stehen gelassen, bis er lufttrocken war, in Äther gelöst und in den vorher genau gewogenen Kolben gegossen. Der Äther wurde vollständig abdestilliert, im Leuchtgasstrom wie oben getrocknet und genau gewogen. Die gewogene Substanz acetylierte ich wie oben und bestimmte wie oben die Menge der Essigsäure, die hierbei gebunden wurde.

In den folgenden Tabellen findet sich in der entsprechenden Spalte die Anzahl Kubikzentimeter Natronlauge angegeben, die der Menge Essigsäure entsprechen, die von der verarbeiteten Menge Essigätherextrakt bzw. dem aus ihm erhaltenen Fettsäuregemisch bei der Acetylierung gebunden wurde. Aus diesen wurde für den Essigätherextrakt „die Acetylzahl" berechnet, d. h. die Anzahl Milligramm Kaliumhydroxyd, die 1 g Extrakt bei der Acetylierung und nachfolgenden Verseifung band: „absolute Acetylzahl" (a). Aus dem für das acetylierte Fettsäuregemisch erhaltenen Werte wurde ebenfalls die Menge Kalihydrat berechnet und auf 1 g des Extraktes bezogen. Man erhält so eine Zahl, die ich im folgenden als „relative Acetylzahl" (b) bezeichnen will.

Tabelle I.

Versuch	Leberextrakt g	Essigätherextrakt	Vom Essigätherextrakt verarbeitet	Fettsäuregemisch	Natronlauge[1]) ccm	Acetylzahlen
1	vom Pferd	6,2897	1,9302		14,8	a. 33,7
	500		4,2588	3,6876	63,2	b. 64,7
2	do.	5,4321	2,6542		19,2	a. 31,8
			2,7758	2,3721	39,1	b. 62,1
3	vom Rind	4,3829	2,2131		23,4	a. 46,5
	600		2,1679	1,8699	36,2	b. 73,2
4	do.	3,4947	2,0258		21,3	a. 46,3
			1,3931	1,1958	25,3	b. 80,1

[1]) 1 ccm = 4,4 mg KOH.

Ein Vergleich der absoluten und relativen Acetylzahlen zeigt, daß bei der Verseifung des Essigätherextraktes Stoffe entstehen, die bei der Acetylierung Essigsäure binden.

Nun hatte Y. Nukada im Anschluß an Beobachtungen von F. Röhmann und W. Lummert die Menge des Cholesterins, das sich aus dem Petrolätherextrakt nach der Verseifung gewinnen läßt, mit der Acetylzahl verglichen und gefunden, daß erstere 3,1 bis 5,7 mal kleiner war, als sich aus der Acetylzahl berechnete, und die Vermutung ausgesprochen, daß der Leberextrakt außer Cholesterin auch in Wasser unlösliche Oxysäuren enthielte. Ich habe deswegen in den folgenden Versuchen aus dem Essigätherextrakt vor der weiteren Verarbeitung die freien Fettsäuren mittels Baryt ausgefällt. Der Essigätherextrakt wurde zuerst in einem Gemisch von 1 Teil Äther und 1 Teil Methylalkohol gelöst, mit Phenolphthalein versetzt nnd mit $^n/_2$ methylalkoholischer Barytlösung titriert. Die Barytseife wurde abfiltriert und 6mal mit 5 bis 10 ccm Äther gewaschen.

Das Filtrat wurde im gewogenen Kolben gesammelt und wie oben weiter behandelt.

Tabelle II.

Versuch	Leber vom Pferd g	Essigätherextrakt[1]	Vom Essigätherextrakt verarbeitet	Fettsäuregemisch	Natronlauge[2] ccm	Acetylzahlen	Cholesterin %
5	300		0,7028		9,1	a. 57,0	39,1
		2,0305	1,3271	0,9922	20,4	b. 67,6	46,6
6	700		2,7482		25,4	a. 40,7	27,9
		5,2896	2,5396	2,0284	38,6	b. 66,9	46,1

Die relativen Acetylzahlen zeigen auch hier eine Zunahme im Vergleich zu den absoluten.

Es sind also im neutralen Essigätherextrakt der Pferde- und Rindslebern, wie er durch Extraktion der Gesamtleber gewonnen wird, Stoffe vorhanden, aus denen bei der Verseifung in Wasser unlösliche Körper mit Hydroxylgruppen entstehen. Der einzige derartige Körper, der bisher bekannt ist, ist das Cholesterin. Ein Teil dieses Körpers ist nach bis-

[1] Seifenfrei.

[2] 1 ccm = 4,4 mg KOH.

her nicht veröffentlichten Versuchen, die schon vor längerer Zeit von H. Ziesche im hiesigen Laboratorium angestellt worden sind, frei in der Leber enthalten.

Dieses freie Cholesterin bedingt mindestens zum Teil die absolute Acetylzahl. Ein Teil des Cholesterins ist aber esterartig gebunden und bedingt bei der Verseifung die Zunahme der Acetylzahl. Lactone, Anhydride von γ-Oxyfettsäuren, kommen nicht in Betracht, da sie zwar bei der Verseifung aufgespalten werden, nach dem Übersäuern der Seifenlösung und Trocknen der Fettsäuren sich aber wieder zurückbilden würden.

Wie viel von dem Cholesterin frei und wie viel gebunden ist, ließe sich aus den Acetylzahlen berechnen, wenn der Essigätherextrakt der Leber nur Cholesterin, Cholesterinester und Neutralfette enthielte: 1 ccm meiner Lauge entsprach 0,0303 g Cholesterin. Es enthielt also der Essigätherextrakt in Versuch 5 $9{,}1 \times 3{,}03 : 0{,}7028 = 39{,}1\,\%$, in Versuch 6 $27{,}9\,\%$ freies Cholesterin. Die Menge des Gesamtcholesterins betrug etwa $46\,\%$, von diesen waren also 15 bzw. $39\,\%$ esterartig gebunden.

Berechne ich die Menge des Cholesterins auf 100 g frische Leber, so erhalte ich in Versuch 5 0,31 g, in Versuch 6 0,34 g. Y. Nukada fand in seinen Versuchen nur 0,19 bzw. 0,21 g Cholesterin (Gesamtmenge der hoch molekularen Alkohole) in 100 g Pferdeleber. Die Vergleichbarkeit unserer Versuche vorausgesetzt, müßte also der neutrale Essigätherextrakt neben Cholesterinestern der Fettsäuren auch Ester von Oxyfettsäuren enthalten. Weitere Versuche sollen entscheiden, ob dies wirklich der Fall ist.

Zur Kenntnis der in Essigäther löslichen Stoffe tierischer Organe und ihres Verhaltens bei der Autolyse. II.

Von

Kenro Kondo.

Enthält die Leber ein Cholesterinester spaltendes Enzym?

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 26. April 1910.)

In der vorhergehenden Mitteilung hatte ich gezeigt, daß im Essigätherextrakt der Rinder- und Pferdeleber neben freiem Cholesterin anscheinend eine gewisse Menge von Cholesterinestern enthalten ist. Das durch Verseifen des Essigätherextraktes gewonnene Gemisch von Fettsäuren und Cholesterin hatte eine um so viel größere Acetylzahl als der ursprüngliche Essigätherextrakt, daß sie ein Freiwerden von Hydroxylgruppen bei der Verseifung bewies.

Von dem freien Cholesterin dürfen wir nach den Versuchen, die Ch. Kusumoto im hiesigen Laboratorium angestellt hat, annehmen, daß es zum Teil von den roten Blutkörperchen herrührt, die in der Leber ihren Untergang finden. Es war aber auch möglich, daß Cholesterin in der Leber durch Enzymwirkung aus Cholesterinestern entsteht, die ihr bekanntlich mit dem Blutplasma zugeführt werden, möglicherweise aber auch im Stoffwechsel der Leberzellen sich bilden könnten.

Zu untersuchen, ob ein cholesterinesterspaltendes Enzym in der Leber enthalten ist, war der Zweck der folgenden unter Leitung von Prof. F. Röhmann angestellten Versuche. Es sollte zunächst nur festgestellt werden, ob bei der Autolyse die Menge der acetylierbaren Stoffe zunimmt.

a) Autolyse des Leberextraktes ohne Zusatz.

Methode der Untersuchung: 500 g Leber wurden zermahlen und mit der doppelten Menge destillierten Wassers angerührt, das in dem einen

Versuche mit 5% Chloroform und 0,5% einer alkoholischen Thymollösung, in den anderen Versuchen mit 1% Fluornatrium versetzt wurde. Das Gemisch blieb unter wiederholtem Umrühren oder Schütteln 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde durch Gaze filtriert und der auf dem Gazefilter bleibende Brei abgepreßt.

Das Filtrat wurde in zwei Teile von je etwa 600 ccm geteilt. Zu jedem der beiden wurden 80 ccm einer 1%igen Natriumcarbonatlösung hinzugegeben. Der eine Teil wurde mit etwa halbnormaler Salzsäure versetzt, bis rotes Lackmoidpapier nur schwach gebläut wurde, und im kochenden Wasserbade erhitzt. Der andere Teil wurde in verschlossener Flasche für 48 Stunden bei 37° C im Brutofen stehen gelassen. Nach Verlauf dieser Zeit reagierte diese Probe noch immer auf Lackmus schwach alkalisch. Nach der Digestion wurde die Flüssigkeit wie die Kontrollprobe mit halbnormaler Salzsäure für rotes Lackmoidpapier annähernd neutralisiert und im kochenden Wasserbade erhitzt. Hierbei schied sich ein Eiweißgerinnsel ab, das sämtliche Fette, Lecithine usw. mit niederriß und auch die Fettsäuren enthielt, die aus vorgebildeten oder bei der Digestion entstandenen Seifen durch die Salzsäure in Freiheit gesetzt worden waren. Der Niederschlag wurde auf einer Nutsche abgesaugt, das Filtrat war wasserklar. Der Filterrückstand wurde auf der Nutsche gut abgepreßt und 3mal mit Alkohol — 400 ccm 94%igem Alkohol auf 600 ccm Leberextrakt — ausgekocht, wobei der Niederschlag jedesmal nach dem Kochen abgesaugt und abgepreßt wurde. Die Extrakte wurden auf dem Wasserbade bei erniedrigtem Drucke eingeengt. Aus dem Alkoholrückstand wurde, wie in meiner ersten Mitteilung beschrieben, der Essigätherextrakt hergestellt; dieser — in einer Reihe von Versuchen (siehe die Tabellen) nach Ausfällung der freien Fettsäuren — acetyliert und die bei der Acetylierung gebundene Essigsäure bestimmt.

Tabelle I.

Autolyse ohne Zusatz.

Versuch	Leberextrakt von	Menge des Essigätherextraktes	NaOH ccm	Acetylzahlen
1[1])	Rind 650 ccm	0,8284	8,5[2])	52,1
		0,7324	8,1	57,1
2[1])	„ 600 „	0,8012	7,8	49,7
		0,7408	7,7	53,0
3[3])	Pferd 600 „	0,3440	2,7[4])	47,3
		0,3870	5,2	81,0
4[3])	„ 600 „	0,3734	3,1	56,2
		0,3921	4,8	73,8

[1]) Digestion unter Zusatz von Chloroform und Thymol.

[2]) 1 ccm = 5,1 mg KOH.

[3]) Digestion unter Zusatz von Fluornatrium, Ausfällung der freien Fettsäuren.

[4]) 1 ccm = 6,0 mg KOH.

Zur Beurteilung der Frage, ob bei der Autolyse eine Spaltung der Cholesterinester stattgefunden haben kann, können wir ohne weiteres die Anzahl Kubikzentimeter Natronlauge benutzen, die der bei der Acetylierung gebundenen Menge Essigsäure entsprechen. Wir sehen dann aus der Tabelle, daß in den Versuchen mit Leberextrakt vom Rinde keine Spaltung der Ester nachweisbar war. In den beiden Versuchen mit Extrakten von Pferdelebern war eine geringe Zunahme der Acetylzahlen zu beobachten.

b) Autolyse unter Zusatz einer Cholesterinester-Ölemulsion.

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob nicht etwa eine größere Esterspaltung nachweisbar war, wenn man den Leberextrakten Cholesterinester zusetzte; denn es war möglich, daß bei der Extraktion der Lebern mit Wasser mehr von dem Fermente als von den Estern in Lösung ging.

Es wurde nur Cholesterinoleat benutzt. Zu seiner Darstellung wurde 1 Teil Cholesterin mit 3 Teilen Ölsäure im Ölbade unter Einleiten eines Kohlensäurestromes 3 bis 4 Stunden auf etwa 200° C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die Masse unter gelindem Erwärmen in 94%igem Alkohol und etwas Äther gelöst und für 24 Stunden in den Eisschrank gestellt. Das sich hierbei ausscheidende Cholesterinoleat wurde abgesaugt und mit kaltem Alkohol gewaschen. Die Krystallmasse wurde mehrmals aus Alkoholäther umkrystallisiert. Mit Rücksicht auf die Kostbarkeit des Cholesterins wurde aber das Umkrystallisieren, das immer mit Verlusten verbunden ist, nicht bis zur völligen Reinigung des Präparates (Schmelzp. 42°) fortgesetzt, zumal weder die Anwesenheit von Cholesterin noch die Beimischung von Öl in den folgenden Versuchen störend wirken konnte.

Der Leberextrakt wurde in der üblichen Weise unter Zusatz von Chloroform-Thymol bzw. Fluornatrium hergestellt. Dann wurde der Cholesterinester unter gelindem Erwärmen in einem Gemisch von 9 Teilen Olivenöl und 1 Teil Ölsäure gelöst und dieses Gemisch durch Eintragen in 1%ige Natriumcarbonatlösung emulgiert, wobei je nach der Reaktion des Leberextraktes (Prüfung mit rotem Lackmoidpapier) 30 bis 80 ccm verwendet wurden. Die Emulsion wurde dem Leberextrakt zugefügt und dieser in 2 Teile geteilt, von denen der eine nach Zusatz der entsprechenden Menge Salzsäure aufgekocht, der andere 48 Stunden in der Wärme — in einer Reihe von Fällen unter gelindem Schütteln — stehen blieb.

In einer Anzahl dieser und anderer Autolysenversuche überzeugte ich mich durch Abimpfen auf Nährgelatine-Agar oder Bouillon, daß die zugesetzte Menge von Chloroform-Thymol bzw. Fluornatrium zur Entwicklungshemmung der Bakterien genügte.

Tabelle II.

Autolyse unter Zusatz von Cholesterinester-Ölemulsion.

Versuch	Leberextrakt von	Zusatz von Chol.-Ester g	Zusatz von Ölmischung g	Menge des Essigäther-Extraktes	NaOH ccm	Zunahme
1[1])	Rind 700 ccm	1	5	5,4805	18,8	
				3,8459	25,6	6,8
2[2])	„ 700 „	1	3	2,7941	19,5	
				2,2825	28,5	9,0
3[2])	„ 650 „	1	2	2,7757	8,9	
				2,9629	13,8	4,9
4[3])	„ 600 „	0,8	2	2,8550	11,2	
				3,1068	13,3	2,1
5[3])	Pferd 600 „	0,8	2	1,8591	6,3	
				2,1620	18,6	12,3
6[3])	„ 600 „	0,8	2	2,2917	8,2	
				2,5148	12,1	3,9
7[3])	„ 600 „	0,8	2	0,9800[4])	6,9	
				1,4198	16,0	9,1
8[2])	„ 600 „	0,8	2	2,9618[4])	15,2	
				3,0010	23,5	8,3
9[3])	„ 600 „	0,8	2	2,4011[4])	19,8	
				2,6629	28,4	8,6

In allen diesen Versuchen, 4 mit Rinds- und 5 mit Pferdeleber, nimmt die Acetylzahl nach Zusatz des Cholesterinester-Ölgemisches zu. Da in den Versuchen mit Rindsleber ohne Zusatz (siehe Tabelle I) keine Zunahme stattfand, scheint also eine Spaltung des zugesetzten Esters zu erfolgen. Auch in den Versuchen mit Pferdelebern nahmen die Acetylzahlen zu. Die Zunahmen sind bei ihnen im Durchschnitt größer als in den beiden Versuchen der Tabelle I ohne Zusatz. Die Versuche sprechen also anscheinend für eine Spaltung von Cholesterinestern bei der Autolyse.

Zur Kontrolle dieses Schlusses wurden die folgenden Versuche angestellt.

c) Digestion der Cholesterinester-Ölemulsion mit Wasser.

Um zu sehen, wie groß etwa die unvermeidlichen Beobachtungsfehler der Untersuchungsmethode an sich sind, wurde

[1]) Chloroform-Thymol.

[2]) Chloroform-Thymol, geschüttelt.

[3]) Fluornatrium, geschüttelt.

[4]) Nach Entfernung der freien Fettsäuren.

der Cholesterinester mit dem Ölgemisch und Natriumcarbonat in Wasser emulgiert. Ein Teil der Emulsion wurde sofort eingedampft und der Rückstand wie oben weiter bearbeitet, der andere Teil wurde in dem Versuch 1 mit Chloroform und Thymol versetzt und ohne Schütteln, im Versuch 2 mit Fluornatrium versetzt und unter Schütteln im Wärmeschrank stehen gelassen.

Tabelle III.

Kontrollversuche.

Versuch	Wasser ccm	Zusatz von		Essigäther-extrakt	NaOH ccm
		Chol.-Ester	Ölgemisch		
1	600	1,0	3,0	3,4989	4,8
	600	1,0	3,0	3,4758	4,4
2	600	1,0	2,5	3,3825	4,7
	600	1,0	2,5	3,3988	4,5

Beim Stehen der wässerigen, sodaalkalischen Emulsion fand keine Zunahme der Acetylzahlen statt; der Ester wurde nicht gespalten. Daß beim Acetylieren überhaupt eine gewisse Menge Essigsäure gebunden wurde, zeigt, daß der Cholesterinester noch mit Cholesterin verunreinigt war bzw. daß das Ölgemisch eine kleine Menge Oxyfettsäuren enthielt.

d) Digestion der Cholesterinester-Ölemulsion mit gekochtem Leberextrakt.

Es wurde weiter untersucht, wie sich die Cholesterinesteremulsion verhält, wenn sie mit gekochtem Leberextrakt stehen bleibt. Bei allen Versuchen wurden Fluornatriumextrakte von Rinds- und Pferdelebern verwendet, die in der gewöhnlichen Weise hergestellt worden waren. Nach Zusatz der Emulsion wurden 600 ccm sofort weiter verarbeitet, andere 600 ccm wurden 48 Stunden in der Wärme stehen gelassen. In Versuch 4 und 5 wurden die freien Fettsäuren aus dem Essigätherextrakte ausgefällt.

Aus den Zahlen in Tabelle IV ist zu ersehen, daß auch beim Digerieren der Cholesterinester-Ölemulsion im gekochten Leberextrakte keine Zunahme der Acetylzahl eintrat.

Wenn dies, wie die Tabellen I und II zeigen, im nicht gekochten Leberextrakt der Fall war, so beweist dies, daß bei der Digestion in Essigäther lösliche Körper mit Hydroxyl-

gruppen entstanden. Um zu entscheiden, ob es sich hierbei, wie wir bisher annahmen, wirklich um eine Spaltung von Cholesterinestern handelte, war noch folgendes zu berücksichtigen.

Tabelle IV.
Kontrollversuche.

Versuch	Leber	Zusatz von Cholesterinester	Zusatz von Ölemulsion	Essigätherextrakt	NaOH
1	Pferd	0.8	2,0	2,0854	8,9
		„	„	2,0726	9,8
2	„	„	„	2,5241	8,1
		„	„	2,6123	8.7
3	Rind	1,0	„	2,7424	9,2
		„	„	2,7431	9,4
4	Pferd	0,8	„	1,8374	5,0
		„	„	1,8137	5,8
5	„	„	„	1,9836	6,2
		„	„	1,9830	6,0

Es wurde schon in der ersten Mitteilung darauf hingewiesen, daß nach den Beobachtungen von Y. Nukada[1]) außer Cholesterin im Leberextrakte auch andere in Petroläther lösliche Stoffe enthalten sind, die sich acetylieren lassen.

Y. Nukada vermutete, daß dies Oxyfettsäuren seien.

Es lag daher die Annahme nahe, daß Oxyfettsäuren auch bei der Autolyse entstanden, und zwar Dioxystearinsäure aus der Ölsäure, die in der Leber frei, bzw. als Seife und in Estern — Fetten oder Cholesterinester — enthalten sein konnte. Die Oxyfettsäuren konnten sich nach der Autolyse zum Teil im Essigätherextrakte als freie Fettsäuren finden. Es war aber auch möglich, daß die Oxydation ohne Spaltung der Ester stattfand. Dies konnte eine Zunahme der Acetylzahlen auch im fettsäurefreien Essigätherextrakte bedingen. Die Zunahme durfte also nicht ohne weiteres, wie wir es bisher taten, auf eine Spaltung der Cholesterinester bezogen werden.

Unter diesem Gesichtspunkte wurde in dem folgenden Versuch der Leberextrakt digeriert, nachdem er nur mit

[1]) Diese Zeitschr. 14, 419, 1908.

der Ölemulsion, ohne Zusatz des Cholesterinesters, vermischt worden war.

e) Autolyse des Leberextraktes nach Zusatz einer Ölemulsion.

Die Ölemulsion wurde wie in den Versuchen mit dem Cholesterinester hergestellt durch Vermischen eines Gemenges aus 9 Teilen Olivenöl und 1 Teil Ölsäure mit einer 1%igen Sodalösung. 1200 ccm des Leberextraktes enthielten 4 g des Ölgemisches. Sie wurden in 2 Teile geteilt, von denen der eine sofort verarbeitet, der andere für 48 Stunden in den Brutschrank gestellt wurde.

Tabelle V.

Autolyse unter Zusatz von Ölemulsion.

Versuch	Leberextrakt 600 ccm	Essigäther-extrakt	NaOH ccm[1])
1	Pferd[2])	1,8567	8,3
		2,5261	15,4
2	„	2,7824	10,4
		2,7812	16.5
3	Rind[4])	2,5304	11,2
		2,5210	15,8
4	Pferd[3])	1,6702	13,2
		1,8755	15,5
5	„ [3])	1,7761	15,3
		1,8978	20,1

Die Acetylzahlen nahmen zu. Um zu entscheiden, ob das Öl bzw. die Ölsäure oxydiert oder der im Leberextrakt enthaltene Ester gespalten wurde, vergleichen wir diese Zahlen mit denen der Tabelle I, wo der Leberextrakt ohne Zusatz digeriert wurde. Um den Vergleich zu erleichtern, sind auf der folgenden Tafel VI die Zunahmen der acetylierbaren Substanzen aufgeführt, ausgedrückt in den entsprechenden Mengen Natronlauge.

---

[1]) 1 ccm = 6,03 mg KOH.

[2]) Zusatz von Fluornatrium.

[3]) Zusatz von Fluornatrium, Fällung der Fettsäuren aus dem Essigätherextrakt.

[4]) Zusatz von Chloroform und Thymol.

Tabelle VI.

Ohne Zusatz			Zusatz von Cholesterinester-Ölemulsion						Zusatz von Ölemulsion		
Versuch	Leber	Zunahme	Versuch	Leber	Zunahme	Versuch	Leber	Zunahme	Versuch	Leber	Zunahme
1[1])	Rind	—	1[1])	Rind	6,8	5[2])	Pferd	12,3	3[1])	Rind	4,6
2[1])	„	—	2[1])	„	9,0	6[2])	„	3,9	2[1])	„	6,1
3[3])	Pferd	2,5	3[1])	„	4,9	7[3])	„	9,1	1[3])	Pferd	7,1
4[3])	„	1,7	4[1])	„	2,1	8[3])	„	8,3	4[3])	„	2,3
						9[3])	„	8,6	5[3])	„	4,8

Beim Rinde sprechen die Zunahmen, die in den Versuchen mit Ölemulsion beobachtet wurden, für eine Oxydation. Denn in den Versuchen ohne Zusatz hatte die Acetylzahl nicht zugenommen, in denen mit Ölemulsion sehr deutlich. Da in den Versuchen mit Rindslebern die freien Fettsäuren nicht entfernt worden waren, konnte es sich um eine Oxydation der freien und gebundenen Ölsäure handeln.

Auch beim Extrakt der Pferdeleber ist die Zahl für den Extrakt, in dem die Fettsäuren nicht entfernt wurden, größer als für die Extrakte ohne Zusatz. Vergleicht man mit letzteren die beiden Versuche, in denen die Fettsäuren aus dem Extrakt entfernt wurden, so ist in dem einen kein Unterschied wahrnehmbar, in dem anderen ist auch hier nach Zusatz des Öls die Oxydation größer. Es mag also unentschieden bleiben, ob eine Oxydation der gebundenen Ölsäure stattfindet, eine Oxydation der Ölemulsion scheint aber bei der Autolyse zu erfolgen.

Haben wir somit in unseren Autolyseversuchen mit zwei Wirkungen — Oxydation der Ölsäure und Spaltung von Cholesterinestern — zu rechnen, so müssen wir erwarten, daß — ein entsprechend energisches Ferment vorausgesetzt — die Acetylzahlen in den Versuchen mit Cholesterinester-Ölemulsion größer waren als in denen mit Ölemulsion allein.

Das war in zweien der Versuche mit Rindslebern auch der Fall, in zwei anderen aber nicht. Hier ist also der Beweis für das Vorhandensein eines Fermentes das die

[1]) Zusatz von Chloroform und Thymol.
[2]) Zusatz von Fluornatrium.
[3]) Zusatz von Fluornatrium, Fällung der freien Fettsäuren.

Cholesterinester spaltet, bisher noch nicht mit Sicherheit erbracht.

Vergleicht man weiter die Versuche mit Pferdelebern, so haben wir auch hier in den Versuchen mit Cholesterin-Ölemulsion, in denen die freien Fettsäuren nicht entfernt wurden, Schwankungen: zweimal eine Zunahme, einmal keine Zunahme. In den Versuchen, wo die freien Fettsäuren ausgefällt worden waren, ist aber in den beiden Versuchen mit Cholesterinester die Zunahme der Acetylzahl erheblich größer als in denen mit Ölemulsion allein. Hier stehen die Zunahmen von 8,3 und 8,6 im Esterversuch gegenüber den Zunahmen von 2,3 und 4,8 im Ölversuch.

Der Unterschied aus dem Mittel beider Doppelversuche ist $8{,}4 - 3{,}5 = 4{,}9$ ccm NaOH. Dies entspricht einer Menge von $4{,}4 \times 6{,}03 \times 651/56 = 0{,}308$ g Cholesterinoleat, d. h. es wurde weniger als die Hälfte des zugesetzten Cholesterinesters gespalten. Hierzu käme noch eine Menge von etwa

$$2 \times 6{,}03 \times 651/56 = 0{,}13 \text{ g},$$

die vielleicht im Leberextrakt selbst enthalten sein konnte.

Die Gesamtheit der Versuche gestattet den Schluß, daß in der Pferdeleber — vielleicht auch in der Rindsleber — ein wenn auch anscheinend nur schwach wirkendes Enzym vorhanden ist, das Cholesterinester spaltet.

Zur Kenntnis der in Essigäther löslichen Stoffe tierischer Organe und ihres Verhaltens bei der Autolyse. III.

Von

Konro Kondo.

Über die Bildung von Oxyfettsäuren bei der Autolyse der Leber.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 26. April 1910.)

In den Versuchen der vorhergehenden Mitteilung war darauf geachtet worden, ob neben einer etwaigen Spaltung der im Leberextrakt enthaltenen Cholesterinester auch eine Oxydation des Öles stattfand, bei welcher der mit dem Glycerin bzw. Cholesterin verbundene Ölsäurerest hydrolysiert wurde. Das Ergebnis war bisher kein derartiges, um eine solche Oxydation mit Sicherheit behaupten zu können.

Günstiger fielen die folgenden Versuche, in denen das Verhalten der Fettsäuren untersucht wurde, die nicht im fettsäurefreien Essigätherextrakt gebunden enthalten waren, sondern teils aus dem Essigätherextrakt mit Baryt abgeschieden, teils durch Verseifen der in Essigäther unlöslichen Substanzen des Alkoholextraktes gewonnen wurden.

Die Versuche wurden im unmittelbaren Anschluß an die in der vorhergehenden Mitteilung beschriebenen Untersuchungen der Essigätherextrakte ausgeführt. Der Alkoholextrakt, der vor bzw. nach der Autolyse aus dem wässerigen Leberextrakt erhalten worden war, war, wie erwähnt, durch Behandlung mit Essigäther in einen in kaltem Essigäther löslichen und einen in kaltem Essigäther unlöslichen Teil zerlegt worden. Letzterer wurde von neuem wiederholt mit heißem Alkohol ausgekocht. Die alkoholische Lösung wurde mit 5 bis 8 g Kaliumhydroxyd,

bei Verarbeitung von 600 bis 700 g Leberextrakt, versetzt und etwa 1 Stunde auf dem Wasserbade erhitzt. Dann wurde mit Wasser verdünnt und zunächst nur so viel Salzsäure zugefügt, daß die Flüssigkeit auf rotes Lackmoidpapier annähernd neutral reagierte, dann wurde der Alkohol durch wiederholtes Abdampfen mit Wasser entfernt und die Flüssigkeit mit Salzsäure übersättigt. In diese Flüssigkeit wurden die Barytseifen des Essigätherextraktes gegeben, die in der Weise gewonnen worden waren, daß man zu dem in einem Gemisch von Äther und Methylalkohol gelösten Essigätherextrakt methylalkoholische Barytlösung bis zur Rötung der mit Phenolphthalein versetzten Lösung hinzugefügt hatte. Die durch Salzsäure abgeschiedenen Fettsäuren wurden abfiltriert und mit heißer 10%iger Kochsalzlösung säurefrei gewaschen. Die Fettsäuren wurden in Äther gelöst und mit destilliertem Wasser zur völligen Entfernung der Chloride gelinde geschüttelt. Die Ätherlösung wurde in einen gewogenen Kolben gegossen, der Äther abdestilliert und der Rückstand im Leuchtgasstrome getrocknet. Er wurde acetyliert und die hierbei gebundene Menge Essigsäure in der früher beschriebenen Weise bestimmt.

Versuch	Extrakt der Pferdeleber	Fettsäuren g	NaOH ccm	Zunahme
Tab. IV Nr. 4	Gekocht nach Zusatz von Cholesterinester-Ölemulsion	1,4260 1,5415	17,4 19,0	1,6
Nr. 5	„	1,5018 1,5032	16,8 16,0	—
Tab. I Nr. 3	ohne Zusatz	1,0025 1,0203	12,1 14,2	2,1
Nr. 4	„ „	1,0157 1,0142	6,4 15,8	9,4
Tab. II Nr. 7	Cholesterinester-Ölemulsion	1,9121 2,2312	8,9 12,1	3,2
Nr. 8	„	1,8083 1,8568	8,2 12,8	3,4
Nr. 9	„	1,4200 1,4396	14,5 25,2	10,7
Tab. V Nr. 4	Ölemulsion	1,9839 2,4662	6,6 11,4	4,8
Nr. 5	„	1,3820 1,3574	15,8 32,2	16,4

Auf der vorhergehenden Tafel sind die Ergebnisse verzeichnet. Die erste Spalte weist auf die entsprechenden Versuche der Mit-

teilung II hin, in denen bereits die Acetylzahl des Essigätherextraktes bestimmt worden war. In der zweiten Spalte ist die Gesamtmenge der in Wasser unlöslichen Säuren aufgeführt, die in dem aus dem Wasserextrakt der Leber gewonnenen Alkoholextrakt frei und gebunden enthalten sind, letzteres, soweit sie sich nicht in Glycerin- oder Cholesterinestern finden. Als solche Stoffe, die in kaltem Essigäther schwer löslich sind, kommen wesentlich die Lecithine in Betracht. In der dritten Spalte finden sich die Mengen Natronlauge angegeben, die der bei der Acetylierung gebundenen Essigsäure entsprechen, in der vierten die Zunahme, die bei der Digestion eintrat.

Der Vergleich der autolysierten Proben mit den Versuchen, in denen der Leberextrakt erst nach dem Kochen digeriert wurde, zeigt, daß bei der Autolyse die Menge der acetylierbaren Fettsäuren zunahm. Es fand anscheinend eine Oxydation von Fettsäuren zu Oxyfettsäuren statt, die nicht durch Autoxydation erfolgte, sondern durch irgendeinen im Leberextrakt enthaltenen Sauerstoffüberträger. Wenn wir annehmen, daß die Oxyfettsäure eine Dioxystearinsäure $C_{18}H_{36}O_4$, Mol.-Gew. 316, war, so entsprach 1 ccm der Natronlauge $6{,}0 \cdot 316 : 56 = 33{,}8$ mg Dioxystearinsäure. Es enthielten die Fettsäuren des Extraktes der Versuche auf

Tab. I Nr. 3	vor	der	Digestion	40,9%	Oxyfettsäuren,
	nach	„	„	47,1%	„
Nr. 4	vor	„	„	21,4%	„
	nach	„	„	52,8%	„

Die Menge der Oxyfettsäuren wäre hiernach so bedeutend, daß der Versuch ihrer Darstellung nicht aussichtslos erscheint.

Über den Einfluß des Sauerstoffdrucks auf den Gaswechsel einiger Meerestiere.

Von

Martin Henze.

(Aus der chemisch-physiologischen Abteilung der zoologischen Station zu Neapel.)

(Eingegangen am 29. April 1910.)

Unseren heutigen Anschauungen zufolge ist der respiratorische Gaswechsel der Warmblüter in weitem Maße unabhängig vom äußeren Sauerstoffdruck. Für die Wirbellosen ist die Frage nach dem Einfluß wechselnder Sauerstoffdrucke auf den Gaswechsel meines Wissens nur einmal, und zwar von Thunberg[1]), aufgeworfen worden. Thunberg fand, daß sich bei Limax, Tenebrio und Lumbricus der Sauerstoffverbrauch im Gegensatz zu der allgemeinen Anschauung mit dem jeweiligen Sauerstoffdruck änderte. — Untersuchungen über den Einfluß äußerer Faktoren auf die Atmung verschiedener Meerestiere führten mich dazu, auch das Verhalten solcher Organismen in sauerstoffreicherem und sauerstoffärmerem Wasser zu beobachten und gaben gerade in Hinblick auf die Thunbergschen Angaben Anlaß, diese an Meeresorganismen noch nicht studierte Frage weiter zu verfolgen. Dabei sei ausdrücklich hervorgehoben, daß es sich nicht um Beobachtungen unter abnorm hohen Sauerstoffdrucken handelte. Die deletären Wirkungen solcher Drucke sind seit den Arbeiten Berts bekannt und an Ver-

---

[1]) L. Thunberg, Der Gasaustausch einiger niederer Tiere in seiner Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. Skand. Arch. f. Physiol. 17, 133.

tretern der verschiedensten Tierklassen studiert worden. Ebenso wenig kam das andere Extrem in Frage, nämlich das Verhalten der Tiere bei völligem Sauerstoffmangel. Was dabei als normaler Druck oder besser als Optimum des Druckes zu bezeichnen ist, wird sich bei näherem Zusehen für die verschiedenen Organismen ohne Zweifel als ziemlich schwankender Begriff herausstellen; das ist erklärlich, wenn man sich die biologischen Verhältnisse und die verschiedenen Lebensbedingungen gerade der Meeresorganismen vergegenwärtigt.

In den folgenden Versuchen, zu denen Meeresorganismen der verschiedensten Tierklassen herangezogen wurden, wurde zunächst einfach bestimmt, ob beim Verweilen derselben in Wasser von wechselndem Sauerstoffgehalt ihr Sauerstoffkonsum konstant blieb resp. sich änderte.

Mit Ausnahme einiger im Anhang mitgeteilter Vorversuche wurde vorerst von der gleichzeitigen Bestimmung der Kohlensäure abgesehen, hauptsächlich infolge der Schwierigkeiten, die die exakten Bestimmungen kleiner Kohlensäuremengen im Meerwasser bedingen.

Die Methodik war demnach eine höchst einfache. Die Tiere wurden in entsprechend großen, mit dem jeweilig benutzten Wasser gefüllten, gut schließenden Stöpselflaschen gehalten, die in einem Thermostaten standen. Die Versuchsdauer wurde so gewählt, daß bei deutlich wahrnehmbarer Sauerstoffabnahme die Abnahme doch nie mehr als allerhöchstens ca. 20% des Gesamtsauerstoffs betrug. Der Sauerstoffgehalt des Wassers vor und nach dem Versuch wurde nach Winklers Methode titriert. Es ist bekannt, daß die Methode nur dann einwandfreie Resultate liefert, wenn das Wasser frei von organischen Verunreinigungen ist, weshalb dasselbe vorher stets durch ein dickes Faltenfilter filtriert wurde. Sollte sauerstoffreiches Wasser zur Anwendung kommen, so wurde aus einer Sauerstoffbombe längere oder kürzere Zeit Sauerstoff durch das in 5 bis 10 Literflaschen befindliche Wasser geleitet oder dasselbe wurde im umgekehrten Falle einige Zeit mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert. In beiden Fällen änderte sich der Kohlensäuregehalt praktisch nicht.

Das Wasser wurde durch einen bis zum Boden der Versuchsgefäße reichenden Heber eingefüllt. Änderungen im Sauer-

stoffgehalt wurden dabei nicht beobachtet, nur bei sehr hohem Sauerstoffgehalt waren besondere Maßregeln zu nehmen.

Die frisch vom Meere hereinkommenden Tiere wurden erst einige Tage im Aquarium gehalten, teils um sie sich dem etwas veränderten Wasser anpassen zu lassen, teils um festsitzenden Tieren Zeit zu geben, sich in den Versuchsgefäßen wieder anzuheften. Bei der Auswahl der Tiere war die erste Bedingung, daß dieselben in normalem Wasser in gleichen Zeiten gleichen Sauerstoffkonsum aufwiesen. Tiere, die lebhafte unregelmäßige Bewegungen ausführen, oder die sich, z. B. wie Ascidien, öffneten oder schlossen, konnten nicht benutzt werden, da ihr Gasaustausch oft in weiten Grenzen wechselte.[1])

Erläuterungen zu den Tabellen: Der Sauerstoffgehalt des Wassers und Sauerstoffkonsum der Tiere ist angegeben in ccm $^n/_{100}$-Thiosulfat, und zwar stets bezogen auf 280 ccm Wasser, d. h. der Inhalt der Titrationsflasche. Von einer Umrechnung auf ccm O (1 ccm $^n/_{100}$-Thiosulfat entspricht 0,00558 ccm O) wurde abgesehen, ebenso wenig wurden die Berechnungen auf Zeit- und Gewichtseinheit pro Tier gemacht. Solche Bestimmungen sind in vielen Fällen bei Wassertieren schwer oder überhaupt nicht exakt ausführbar. Außerdem genügten im vorliegenden Falle vergleichende Untersuchungen an ein und demselben Individuum.

Der gewöhnliche Sauerstoffgehalt des Meerwassers beträgt bei 15° ca. 5,5 ccm pro Liter. Pro 280 ccm Wasser entspricht dies 23 bis 28 ccm $^n/_{100}$-Thiosulfatlösung.

Ferner sei bemerkt, daß die Tiere vor Beginn des Versuchs in fast allen Fällen erst 10 bis 15 Minuten in dem jeweilig zur Anwendung kommenden Wasser gehalten wurden, so daß ein Diffusionsausgleich in bezug auf den Sauerstoff zwischen Gewebsflüssigkeit und äußerem Milieu stattfinden konnte.

I.

1. Actinia equina: Das zu den Anthozoen gehörige, schön rot gefärbte Tier lebt festsitzend. Es vermag sowohl seine Tentakeln einzuziehen als sich auch stark zu kontrahieren, wodurch mitunter möglicherweise kleine Schwankungen im Gaswechsel bedingt sein könnten. Es wurde dies nicht näher verfolgt; sind diese vorhanden, so sind sie jedenfalls so unbedeutend, daß sie bei den großen Differenzen, die, wie sich im folgenden zeigt, im Sauerstoffkonsum unter wechselnden Drucken zutage treten, nicht in Betracht kommen.

[1]) Es scheint mir nicht unwahrscheinlich, daß Tiere, die sich stark zu kontrahieren vermögen, andererseits aber durch Wasseraufnahme wiederum anschwellen können, hierin ein Mittel besitzen, um ihren Sauerstoffbedarf in gewissem Grade regulieren zu können.

Versuchsreihe 1.

Actinia equina: 3 Exemplare in 660 ccm Wasser, t = 18°. Versuchsdauer 45 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
23.80	3,80
23,80	3,80
37,00	5,10
48,60	9,40
1 Tag dazwischen	
23,50	3,40
2 Tage später	
25,90	4,10
43,80	6,50
25,90	3,50
17,20	2,10
25,30	3,20

Versuchsreihe 2.

Actinia equina: 3 Exemplare in 660 ccm Wasser, t = 19°. Versuchsdauer 75 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
25,60	5,30
47,70	9,40
65,20	10,10
43,35	6,40
26,60	5,20
26,60	5,65
3 Tage später	
26,80	3,60
46,40	8,50
45,50	7,90
87,30	11,20
26,80	3,90

Versuchsreihe 3.

Actinia equina: 5 Exemplare in 500 ccm Wasser, t = 15°. Versuchsdauer 1 St.

O-Gehalt des des Wassers	O-Konsum
26,20	4,40
25,10	4,10
39,90	6,60
38,90	3,20 (?)
40,80	4,80
26,50	3,60
1 Tag später	
26,40	4,80
17,50	2,30
12,50	1,80
10,00	1,50
12,20	1,70
20,90	?
26,10	4,00
1 Tag später	
26,30	3,70
35,50	3,40 (?)
32,20	5,20
26,60	2,90
27,00	3,40
40,40	6,40
26,40	3,60
20,50	2,60
Tiere hierauf 3 St. lang in fließendem Wasser von O = 17,50 gehalten	
18,90	2,50

Versuchsreihe 4.

Actinia equina: Verhältnisse wie im obigen Versuch.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
26,40	4,40
15,20	2,00
Hieran anschließend Tiere 4 St. in fließendem Wasser mit O = 14,70	
17,40	3,40
26,70	4,10

2. Anemonia sulcata: Diese der Actinia nächst verwandte Seerose lebt wie jene angeheftet an Steinen in geringer Tiefe. Ihr gleichmäßiger Gaswechsel machte sie besonders geeignet für die beabsichtigten Versuche.

Versuchsreihe 5.

Anemonia sulcata: 3 Exemplare in 1350 ccm Wasser, t = 19°. Versuchsdauer 2 St.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
25,70	6,10
47,70	8,80
2 Tage später	
25,90	6,85
13,00	4,70
2 Tage später	
25,95	6,85
73,00	9,70
73,00	10,20
1 Tag später	
32,80	7,80
46,30	9,60
25,90	7,70 (?)
1 Tag später	
25,65	6,70
73,80	9,40
25,65	4,65 (?)
5 Tage später	
14,10	4,30
26,00	6,70
6,20	1,55

Versuchsreihe 6.

Anemonia sulcata: 4 Exemplare in 1 l Wasser, t = 16,50°. Versuchsdauer 2 St.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
26,90	7,90
26,90	7,50
27,00	8,30
16,90	3,50
12,20	3,30

Versuchsreihe 7.

Anemonia sulcata: 1 sehr großes Exemplar in 1 l Wasser, t = 15°. Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
26,20	4,50
25,10	4,60
39,90	5,10
44,20	7,10
38,90	0,00 (?)
48,30	4,30
53,70	0,60 (?)
26,30	4,50
26,50	3,00
„	3,30
„	3,50
1 Tag später	
26,40	4,60
16,90	2,30
16,80	2,60
11,10	0,40 (?)
20,50	3,10
10,00	1,10
10,20	1,30
12,20	1,70
20,90	2,80
26,10	3,70
26,10	3,90
1 Tag später	
26,30	2,80
35,50	5,70
33,50	2,50
52,80	5,50
26,60	2,60
27,00	2,30
52,50	4,80
40,40	4,40
1 Tag später	
26,40	3,50
20,50	2,30

Anschließend hieran Tiere in fließendem Wasser von O = 16,50 für 3 St. gehalten

15,30	2,80

Versuchsreihe 8.

Anemonia sulcata: Verhältnisse wie in obiger Versuchsreihe.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
26,40	3,50
20,50	2,30

Tiere hierauf 4 St. in fließendem Wasser von O = 14,70 gehalten.

17,40	2,20
26,70	3,50

Aus den vorstehenden Versuchsreihen ergibt sich, daß der Sauerstoffkonsum beider Anthozoen in deutlicher Weise mit den Änderungen des Sauerstoffdruckes wechselt. Bei graphischer Darstellung der Verhältnisse würde sich zeigen, daß die den

Sauerstoffkonsum unter verschiedenen Drucken illustrierende Kurve anfangs steil ansteigt, um bei höheren Drucken sich einem Maximum zu nähern. Die Änderungen im Sauerstoffkonsum sind nicht nur vorübergehende, wie dies speziell für niedere Drucke schon aus den Versuchsreihen 3, 4, 7 folgt.

Bei Drucken, die den des normalen Wassers übersteigen, zeigte sich bei einigen am Ende des Winters angestellten längeren Beobachtungsreihen, daß der Sauerstoffkonsum plötzlich sehr weit absank, und zwar sogar unter den des Konsums bei normalem Druck (vgl. Versuchsreihe 7). Worauf dies zurückzuführen ist, vermag ich nicht anzugeben. Andere, im Sommer angestellte Beobachtungsreihen von längerer Dauer unter erhöhtem Druck hatten gerade gezeigt, daß auch der supranormale Sauerstoffverbrauch, so lange die Beobachtung fortgesetzt wurde, anhielt. Die speziell darauf gerichteten Versuchsreihen sind im folgenden wiedergegeben:

Versuchsreihe 9.

Actinia equina: 5 Tiere in 500 ccm Wasser, $t = 16{,}3^0$.

Zeitdauer	O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
9^{45}—11^{45}	27,90	4,50
12^{40}— 2^{40}	40,20	9,00
2^{52}— 4^{52}	44,60	9,80

Das Gefäß mit den Tieren wurde jetzt mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen und durch eine in letzteren eingelassene Glasrohrverbindung mit einem großen 50 l-Ballon in Verbindung gesetzt. Der Ballon war mit sauerstoffhaltigem Wasser (O-Gehalt = 46,20) gefüllt. In 35 Min. floß ca. 1 l Wasser aus dem großen Ballon durch das Gefäß mit den Tieren.

Am nächsten Morgen früh 9 Uhr zeigte das Wasser im Tiergefäß O-Gehalt = 42,20, das Wasser im Ballon O-Gehalt = 43,50. Nunmehr wurden die Tiere sofort wieder in O-reiches Wasser übertragen und mit ihnen die folgenden Versuche angestellt:

Zeitdauer	O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch	
9^{25}—11^{25}	43,50	9,00	$t = 15^0$
12 — 2	41,60	8,60	
2^{26}— 4^{26}	28,40	4,80	
Nacht über in Normalwasser			
11^{35}—1^{35}	29,80	5,10	Am folgenden Morgen
1^{40}—3^{40}	29,80	4,80	

Diese Versuchsreihe beweist, daß die Actinien beim Einbringen in das sauerstoffreiche Wasser sofort ihren Sauerstoffkonsum auf etwa das Doppelte erhöhen und diesen Mehrkonsum während der ganzen Versuchsperiode, d. h. also über 24 Stunden lang, unverändert beibehalten. Umgekehrt fällt der Sauerstoffverbrauch sofort wieder auf den normalen Betrag, sowie die Tiere in normales Wasser überführt werden.

Dasselbe Bild zeigen zwei ähnlich angestellte Versuchsreihen mit Anemonia sulcata.

Versuchsreihe 10.

Anemonia sulcata: 4 Tiere in 1000 ccm Wasser; $t = 16°$; Zeitdauer 1 St. 30 Min.

Zeitdauer	O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
9^{10}—10^{40}	27,30	6,50
10^{40}—12^{10}	27,30	6,80
12^{15}— 1^{45}	39,40	8,40
1^{50}— 3^{20}	40,00	7,00 (?)
3^{25}— 4^{55}	40,00	7,90

Jetzt die Tiere in ein großes Gefäß mit Seewasser gebracht, durch das konstant ein Sauerstoffstrom perlte, und bis zum nächsten Morgen darin gehalten. Hierauf eine neue Versuchsreiche angeschlossen.

Zeitdauer	O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch	
9 —10^{30}	47,70	8,20	
11 —12^{30}	53,60	8,40	
12^{35}— 2^{05}	27,80	5,70	← Direkt aus sauerstoffreichem Wasser in Normalwasser übertragen.
2^{10}— 3^{40}	27,80	6,90	

Versuchsreihe 11.

Anemonia sulcata: 5 Tiere in 1500 ccm Wasser; $t = 13{,}5°$; Zeitdauer 1 St. 30 Min.

O-Geh. des Wassers	O-Verbrauch
29,20	4,00
29,20	3,60

Die Tiere wurden nach dieser Bestimmung in Wasser gehalten, das fortgesetzt durch einen Sauerstoffstrom mit Sauerstoff versorgt wurde. Das Wasser enthielt am Ende einer Versuchsdauer von 18 Stunden: O-Gehalt = 85,50. Nach diesem Aufenthalt wurden die Tiere in neues, O-reiches Wasser übertragen und ihr O-Konsum weiter bestimmt.

O-Geh. des Wassers	O-Verbrauch
70,60	10,00

Jetzt die Tiere 15 Min. in laufendem Normalwasser gehalten und hieran anschließend den O-Verbrauch in Normalwasser pro 1 St. 30 Min. wie oben bestimmt.

O-Geh. des Wassers	O-Verbrauch
29,10	3,90
29,20	3,70

Nach dem langen Aufenthalt in dem sauerstoffreichen Wasser, in dem der Sauerstoffverbrauch ungefähr auf das Zweieinhalbfache des normalen angestiegen war, sinkt derselbe sofort ab auf seine normale Größe, sobald die Tiere wieder in Wasser von normalem Sauerstoffpartiardruck gebracht werden.

3. Sipunculus nudus: Der kiemenlose, zu den Gephyreen gehörige Wurm liegt meist bewegungslos in Sand und Schlamm. Es ist anzunehmen, daß sein Sauerstoffbedarf infolge dieser Lebensweise an und für sich ein geringer ist, mithin Wasser von normalem Sauerstoffgehalt für ihn möglicherweise bereits ein Wasser von supranormalem Sauerstoffdruck ist. Mehrfach angestellte Versuche ergaben ferner, daß das Tier in fast völlig sauerstofffreiem Wasser tagelang ungeschädigt lebte.

Die als Blut zu bezeichnende Leibeshöhlenflüssigkeit von Sipunculus ist im Moment der Entnahme hellrötlich gefärbt, nimmt aber beim Sättigen mit Luft oder Sauerstoff einen tief burgunderroten Ton an. Hierbei wird Sauerstoff von seiten des im Blute vorhandenen Hämerythrins fixiert. Winterstein[1]), der kürzlich das Sauerstoffbindungsvermögen dieser hämerythrinhaltigen Flüssigkeit exakt bestimmte, fand dieselbe, wenn sie dem lebenden Tiere unter den nötigen Kautelen entnommen wurde, niemals maximal mit Sauerstoff beladen. Damit im Einklang steht jedenfalls die stets gemachte Beobachtung, daß die im allgemeinen einen rötlichgelben Farbton zeigenden Tiere in sauerstoffreichem Wasser sich ausgesprochen rotbraun färben. Offenbar wird unter dem höheren äußeren Sauerstoffdruck mehr Sauerstoff vom Hämerythrin gebunden. Umgekehrt verfärben sich die Tiere in Wasser mit niederem Sauerstoffgehalt und werden fast weiß.

[1]) H. Winterstein, Zur Kenntnis der Blutgase wirbelloser Seetiere. Diese Zeitschr. 19, 384.

Versuchsreihe 12.

Sipunculus nudus: 2 Exemplare in 660 ccm Wasser, t = 20°, Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
25,90	3,30
25,90	3,50
35,60	4,70
66,40	6,30 (?)
25,90	3,50

Versuchsreihe 13.

Sipunculus nudus: 2 Exemplare in 660 ccm Wasser, t = 20,5°, Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
25,80	3,80
14,10	1,80
21,60	2,40
25,80	4,00
26,00	3,90
6,20	1,10
8,40	2,20
8,40	2,00
25,80	4,10
31,80	5,10
38,90	5,00
57,20	4,30
57,70	5,30
25,80[1])	2,40[1])
25,80	3,80

[1]) Direkt aus O-reichem Wasser übertragen.

Beide Versuchsreihen zeigen zunächst deutlich die Beeinflussung des Sauerstoffkonsums durch den jeweiligen Sauerstoffdruck des Wassers. Speziell Versuchsreihe 13 läßt ferner erkennen, daß die Kurve für den Konsum bei ansteigenden Sauerstoffdrucken im Vergleich zu der der Actinien bereits bei weit niedereren Drucken ihren Höhepunkt erreicht.

In der folgenden Versuchsreihe (Nr. 14) wurden die Tiere für über zwei Tage niedereren Sauerstoffdrucken ausgesetzt und alle halben Stunden der Sauerstoffkonsum bestimmt. Der Konsum bleibt während der ganzen Zeit niedrig, um beim Zurückbringen in Normalwasser sofort wieder seine ursprüngliche Höhe zu erlangen.

Versuchsreihe 14.

Sipunculus nudus: 2 Exemplare in 550 ccm Wasser, t = 20,5°, Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
26,80	3,40
7,70	0,80
7,70	1,10
7,70	1,10
7,90	0,80
10,50	1,50
10,40	1,10
Fortsetzung am folgenden Tag.	
27,70	4,30
27,70	4,50
18,80	3,10
18,80	3,10
18,90	3,00
18,90	2,40
7,60	1,10
7,60	1,00
7,50	0,80
7,50	0,90
7,50	1,00
27,10	4,20
1 Tag dazwischen.	
27,10	4,10
27,10	4,10

Die umgekehrten Verhältnisse sind durch Versuchsreihen 15 und 16 illustriert, in denen die Tiere längere Zeit kontinuierlich unter erhöhten Sauerstoffdrucken beobachtet wurden.

Versuchsreihe 15.
2 Sipunculus in 550 ccm Wasser, $t = 19{,}8°$, Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
27,80	5,30
47,70	[9,30] (?)
48,10	7,60
41,10	6,70
53,60	7,20
53,70	7,20
53,70	7,20
27,80 [1])	3,20 [1])
27,80	4,70
27,80	3,20 (?)
27,80	4,90
27,80	5,00
27,80	5,10

[1]) Direkt übertragen.

Versuchsreihe 16.
Sipunculus nudus: 5 Expemplare in 1000 ccm Wasser, $t = 14°$, Zeitdauer 1 St.

Zeitdauer	O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
3^{10}—4^{10}	26,50	5,90

Die Tiere wurden jetzt in eine 8 l-Flasche gegeben, durch deren Wasser ein Sauerstoffstrom perlte, und darin bis zum nächsten Morgen gelassen. Am Morgen hatte das in dem Tiergefäß befindliche Wasser den O-Gehalt = 82,99 $^n/_{100}$-Thiosulfat. Die Tiere wurden nun direkt in das Respirationsgefäß zur Bestimmung des Sauerstoffkonsums übertragen.

Zeitdauer	O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
9^{50}—10^{50}	48,90	7,00
11 —12	51,90	7,00
12 — 1	50,90	[5,20] (?)
1^{15}— 2^{15}	26,80	5,90
2^{15}— 3^{15}	26,80	6,20
3^{15}— 4^{15}	26,80	5,90
Am folgenden Tage		
10—11	26,60	6,00
11—12	26,60	5,80

II.

Die in diesem zweiten Abschnitte zusammengefaßten Versuchsreihen beziehen sich sämtlich auf höher organisierte Meerestiere, die bei einer ausgebildeten Zirkulation sowohl vermittels Kiemen atmen als auch Sauerstoff fixierende Proteine in ihrem

Blute führen. Es hat sich herausgestellt, daß der Sauerstoffkonsum dieser Tiere — wie bei den Warmblütern — unabhängig vom äußeren Sauerstoffdruck ist.

Unter den Crustaceen wurden die folgenden zwei Vertreter gewählt:

1. Carcinus moenas.

Versuchsreihe 17.

1 Exemplar in 500 ccm Wasser, $t = 16{,}5°$, Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
27,60	3,10
52,60	3,50
60,80	3,50
59,30	3,30
28,70	3,10
28,40	3,10
28,20	3,30
19,50	3,60
11,60	3,00
13,50	3,10
13,60	2,90

Versuchsreihe 18.

Carcinus moenas: 1 Exemplar in 870 ccm Wasser, $t = 21{,}5°$, Versuchsdauer 45 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
25,70[1])	8,90[1])
53,80[1])	7,10[1])
62,80	6,00
25,80	5,80
25,80	5,80
66,20	5,80
25,80	5,90

[1]) Tier noch etwas unruhig.

O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
Ein neues Tier.	
25,50	8,00
57,50	7,40
54,50	7,20

2. Scyllarus latus.

Versuchsreihe 19.

1 großes Exemplar in 1350 ccm Wasser, $t = 20°$, Versuchsdauer 1 Stunde.

O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
26,00	7,70
26,00	7,60
46,80	7,00
26,00	6,40
25,90	7,70
67,00	7,00
39,20	6,40
2 Tage später, O-Konsum ist etwas abgesunken.	
25,70	5,50
53,80	5,50
62,80	7,00(?Fehler)
54,10	5,60
66,20	5,50
25,80	5,30

Zu zwei weiteren Versuchsreihen wurden die Mollusken Aplysia und Eledone gewählt. Die für den Sauerstoffkonsum bei wechselnden Drucken erhaltenen Zahlen stimmen vielleicht nicht so vollständig überein wie z. B. bei den Krebsen. Hauptsächlich liegt dies wohl daran, daß sich die Tiere während der Versuchsperiode nicht gleichmäßig ruhig verhalten. Es ist dies besonders daraus zu schließen, daß die kleinen Differenzen meist nicht parallel mit den Sauerstoffdrucken gehen. Möglicherweise ist aber auch die Hautatmung ein nicht zu vernachlässigender Faktor. Jedenfalls berechtigen die Resultate zu dem Schluß, daß auch der Gaswechsel dieser Tiere unabhängig vom Druck ist.

3. Aplysia limacina.

Versuchsreihe 20.

2 kleine Exemplare in 4 l Wasser, $t = 20^0$, Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
25,60	5,20
25,60	4,60
47,70	5,90
41,20	5,50
65,20	5,40
66,90	6,60(?Fehler)
43,35	4,10
26,65	4,25
26,65	4,40
26,65	4,25

Dieselben Tiere 2 Tage später. Inzwischen gut gefüttert.

26,80	6,30
26,80	6,00
58,90	7,10
48,80	6,90
56,80	5,60
26,80	5,30
26,80	5,80
26,80	5,50

Fortsetzung am folgenden Tag.

26,05	7,30
26,05	6,70
26,05	7,10
23,90	6,70
6,60[1])	3,00[1])
13,60	6,10
26,05	6,50

[1]) Tier asphyktisch.

Bei vermindertem Sauerstoffdruck ist bei einem Gehalt des Wassers von $O = 13{,}60$, d. h. etwa der Hälfte des unter normalen Bedingungen vorhandenen Sauerstoffes, die Atmung offenbar noch ganz normal, während bei $O = 6{,}60$, dem Abfall im Sauerstoffkonsum nach zu urteilen, sich Asphyxie einstellt. Aplysia kann übrigens stundenlang in fast sauerstofffreiem Wasser ohne sichtbare Schädigung existieren.

4. Eledone moschata.

Versuchsreihe 21.

1 Exemplar in 1600 ccm Wasser, $t = 19^0$, Versuchsdauer 1 Stunde.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
23,50	4,20
49,50	3,50
23,50	3,10
Am folgenden Tag.	
22,70	4,00
37,30	4,00

Versuchsreihe 22.

Eledone moschata: 1 Exemplar in 870 ccm Wasser, $t = 20{,}2^0$, Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
25,85[1])	12,15[1])
39,50	10,70
39,90	8,10
25,85	7,40
13,00	8,10

[1]) Tier noch unruhig.

Versuchsreihe 23.

Eledone moschata: 1 Exemplar in 1600 ccm Wasser, $t = 20{,}5^0$, Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
26,10[1])	6,90[1])
26,10[1])	6,20[1])
26,10	5,60
55,50	7,50
74,00	7,70
25,60	5,00
25,60	4,60
13,60	5,20
Am folgenden Tag.	
25,70	6,30
8,90[2])	3,50[2])
8,90[2])	3,40[2])
15,30	5,90
25,70	5,30
25,70	6,30
25,70	5,80
39,00	4,70
40,00	6,20
55,30	5,20

[1]) Tier noch unruhig.
[2]) Asphyktische Erscheinungen.

Die folgenden Versuchsreihen beziehen sich auf die Knochenfische Coris und Sargus annularis. Die Fische sind in ihrem Sauerstoffkonsum völlig unabhängig vom äußeren Sauerstoffdruck. Ähnliche Beobachtungen wurden an Süßwasserfischen schon von Winterstein[1]) gemacht. Bei höheren Sauerstoffdrucken beobachtet man eine deutliche Verminderung der Zahl der Atembewegungen (Apnoe). Unter den gegenteiligen Bedingungen steigt die Frequenz; es treten asphyktische Symptome auf, und dann sinkt auch der Sauerstoffkonsum plötzlich ab.

4. Coris.

Versuchsreihe 24.

1 Exemplar in 1350 ccm Wasser, t = 20,3°. Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
23,70[1])	8,00[1])
23,70[1])	7,50[1])
44,70	5,60
43,80	6,60
23,70	6,30
24,00	6,10
12,30[2])	4,40[2])
12,70[2])	5,10[2])
25,70	7,60

Dasselbe Tier jetzt in 3 l Wasser, Versuchsdauer 1 Stunde.

26,00	6,70
49,10	6,80
25,90	6,40
67,00	5,70

[1]) Tier noch etwas unruhig.
[2]) Tier zeigt beginnende Asphyxie.

5. Sargus annularis.

Versuchsreihe 25.

1 Tier in $1^1/_2$ l Wasser, t = 15° Versuchsdauer 30 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Verbrauch
27,45	5,10
53,40	5,80
54,40	5,30
30,70	5,20
24,50	5,10
60,35	5,60

Ein anderes Tier unter gleichen Verhältnissen.

31,50	6,40
53,00	6,70
49,70	6,40
31,40	6,40
22,20	6,70
12,19[1])	4,30[1])

[1]) Beginnende Asphyxie.

III.

Wie im vorangehenden an einigen Beispielen gezeigt wurde, finden sich unter den Meerestieren einerseits Vertreter, bei denen die Größe des Sauerstoffkonsums völlig unabhängig ist vom Sauertoffdruck des äußeren Milieus. Da wir uns zu der Ansicht Pflügers und Pfeffers bekennen, derzufolge die Zelle, sobald ihr überhaupt hinreichend Sauerstoff zur Verfügung steht, selbsttätig ihren Sauerstoffbedarf reguliert, war dieses Ergebnis hier nicht unerwartet. Lediglich solche Tiere zeigen diese Unabhängigkeit, die in Analogie zu den Warmblütern

[1]) Beiträge zur Kenntnis der Fischatmung. Pflügers Archiv 125, 73.

über Einrichtungen verfügen, vermöge deren den Zellen selbst bei sinkenden Sauerstoffdrucken eine hinreichende Versorgung mit Sauerstoff ermöglicht wird, und zu denen in erster Linie eine ausgebildete Zirkulation sowie Kiemen und respiratorische Pigmente gehören.

Dagegen stehen auf der anderen Seite die in der ersten Gruppe zusammengefaßten Tiere, bei denen das Gegenteil, d. h. eine weitgehende Abhängigkeit des Sauerstoffkonsums vom Sauerstoffdruck konstatiert und zu erklären war. Die Tatsache einer Herabsetzung des Sauerstoffkonsums in sauerstoffärmerem Wasser hätte sich mit der Annahme eines asphyktischen Zustandes natürlich leicht erklären lassen. Dagegen sprach sowohl die Beobachtung, daß die Tiere tagelang ohne Schädigung in sauerstoffarmem Wasser lebten, als auch die weitere Tatsache, daß schon bei eben beginnender Sauerstoffverminderung die Tiere mit einer Verminderung des Sauerstoffkonsums antworteten. Das wichtigste jedoch war, daß auf eine Erhöhung des Sauerstoffdrucks über den des Normalwassers auch eine Steigerung des Sauerstoffkonsums folgte. Hierin nun ohne weiteres einen Widerspruch zur obengenannten Ansicht Pfeffers zu erblicken und mit anderen Worten den Zellen eine Selbststeuerung in bezug auf den Sauerstoffkonsum abzusprechen, schien von vornherein unwahrscheinlich.

Immerhin war es gerade in diesem Zusammenhange von Interesse, einmal experimentell an einer Einzelzelle die von Pflüger und Pfeffer aufgestellte Theorie zu prüfen, was wohl bisher noch nicht geschehen ist. Hierzu dienten befruchtete Eier vom Seeigel (Strongylocentrodus), an denen O. Warburg seine interessanten Respirationsversuche begonnen hat.[1])

Die mehrfach mit filtriertem Wasser gewaschenen Eier von Strongylocentrodus wurden ca. 2 bis 3 Stunden nach der Befruchtung mit Sperma in Wasser aufgeschwemmt und mittels eines Meßzylinders in zwei gleiche Portionen geteilt. Jede Portion wurde in eine Stöpselflasche von genau bekanntem Inhalt gegeben, und nachdem sich die Eier vollkommen abgesetzt hatten, das überstehende Wasser so vollständig als möglich abgehebert und abpipettiert. Die eine Flasche wurde hierauf

[1]) Herrn O. Warburg möchte ich auch hier herzlich für manchen Ratschlag danken.

mit sauerstoffreicherem, die andere mit sauerstoffärmerem Wasser unter den nötigen Vorsichtsmaßregeln gefüllt, worauf beide ca. 1 Stunde im Thermostaten langsam auf einer Drehscheibe bewegt wurden, so daß die Eier stetig im Wasser flottierten. Alsdann wurden die Gefäße ca. 20 Minuten ruhig hingestellt, bis sich die Eier völlig abgesetzt hatten, worauf die Sauerstoffbestimmung im überstehenden Wasser, dessen Sauerstoffgehalt vorher ermittelt worden war, vorgenommen werden konnte.

Versuchsreihe 26.

Eier von Strongylocentrodus ca. $3^1/_2$ Stunden nach der Befruchtung. $t = 17°$. Sauerstoffangaben in Kubikzentimetern $^n/_{100}$-Thiosulfat.

	O-Gehalt d. Wassers	O-Verbrauch		O-Gehalt d. Wassers	O-Verbrauch
1.	30,00	6,60	3.	33,60	4,50
	17,50	6,10		14,00	4,00
2.	47,20	12,50	4.	46,80	9,80
	25,00	12,10		25,10	9,20

Mit dieser Versuchsreihe ist direkt nachgewiesen, daß die Einzelzelle in bezug auf ihren Sauerstoffkonsum unabhängig ist vom äußeren Sauerstoffdruck, oder um die Worte Pfeffers[1]) anzuführen: „Weil die eigene Tätigkeit den Konsum von Sauerstoff ebensogut wie den Konsum der Nährstoffe reguliert, hat auch nach voller Befriedigung des Bedürfnisses die fernere Zugabe von Sauerstoff eine analoge Bedeutung und keinen größeren Einfluß als die übermäßige Zuführung eines Nährstoffes."

Die Zahlen stimmen nicht so vollständig überein, als dies der Fall sein sollte, doch ist dies allein durch die Methode bedingt und ließ sich leider nicht vermeiden. Während nämlich die Flaschen von der Drehscheibe genommen und zum Absitzen der Eier ruhig hingestellt werden, geht natürlich die Atmung weiter, und nun konsumieren die im sauerstoffreicheren Wasser befindlichen Eier in dem Maße, als sie mehr und mehr übereinander zu liegen kommen, mehr Sauerstoff als die im sauerstoffärmeren Wasser befindlichen. Direkt nachgewiesen ist dies in den folgenden Versuchen. Dadurch also erklärt sich, daß der Sauerstoffverbrauch der im O-reicheren Wasser gedrehten Eier eine Kleinigkeit höher erscheint, als er tatsächlich ist. Würde man die Eier, sowie sie von der Drehscheibe kommen, schnell abzentrifugieren und die Sauerstoffbestimmung vornehmen, so würden die Zahlen ohne Zweifel absolut übereinstimmen. Aus Mangel an einer großen Zentrifuge mußte dies unterbleiben.

---

[1]) Pfeffer; Allgemeine Pflanzenphysiologie 1 (2. Aufl.), 547, l. c.

Wie kann man sich nun trotzdem vorstellen, daß bei Tieren wie Anemonia usw., deren Gasaustausch, wie bei der Einzelzelle, doch auch nur auf dem Wege einfacher Diffusion vor sich gehen kann, ein Wechsel im Sauerstoffverbrauch bei wechselndem äußerem Sauerstoffdruck statthat. Wenden wir uns zunächst wieder den Seeigeleiern zu. Wir verfahren genau so wie in Versuchsreihe 26, lassen aber die Eier während des Versuches diesmal ruhig in einer ca. $^1/_2$ cm hohen Schicht am Boden des Recipienten liegen. Was wird zu erwarten sein? Während bei den Eiern der obersten Eischicht der Gasaustausch in vollem Umfange vor sich geht, finden die darunter liegenden Eier bereits weniger Sauerstoff, und die Versorgung mit Sauerstoff wird um so schlechter werden, je weiter die Eier von der Oberfläche nach dem Boden des Gefäßes zu gelegen sind. Veranschaulicht wird dies durch folgenden Versuch, in dem zwei gleiche Eiportionen in dem gleichen Wasser auf zwei gleiche Flaschen verteilt wurden, nur mit dem Unterschiede, daß die eine Flasche gedreht wurde, während die andere ruhig stehen blieb.

Versuchsreihe 27.

Eier von Strongylocentrodus im 4-Zellen-Stadium, t = 17,5°. Dauer 40 Minuten. Sauerstoffgehalt des Wassers 22,60 $^n/_{100}$-Thiosulfat.

Flasche gedreht . . .	11,20	} Sauerstoffverbrauch.
Flasche in Ruhe . . .	4,90	

Nun ist auch ohne weiteres zu erwarten, daß, wenn wir wieder zwei gleiche in einer Schicht gelagerte Eiportionen nehmen, die eine mit O-reichem, die anderen mit O-ärmerem Wasser bedecken und die Atmungsintensität bestimmen, jetzt die im O-reichen Wasser befindlichen Eier mehr Sauerstoff konsumieren werden als die im O-armen Wasser befindlichen. Wie Versuchsreihe 28 zeigt, ist dies tatsächlich der Fall.

Versuchsreihe 28.

Eier von Strongylocentrodus im 4-Zellen-Stadium, t = 17°. Dauer 40 Minuten.

	O-Gehalt d. Wassers	O-Verbrauch		O-Gehalt d. Wassers	O-Verbrauch
1.	37,40	3,70	2.	36,40	3,80
	14,20	2,10		14,60	2,00

Auf Grund der an den Eiern von Strongylocentrodus gesammelten Erfahrungen sind wir nun auch imstande, uns eine

Vorstellung über das Wesen des wechselnden Sauerstoffkonsums der Tiere der ersten Gruppe zu machen.

Der Gaswechsel jener Tiere kann, wie schon oben gesagt wurde, genau wie bei Einzelzellen nur auf dem Wege der Diffusion vor sich gehen. Die Zellen der mit dem Meerwasser direkt in Kontakt kommenden äußeren Zellschicht einer Anemonia z. B. werden daher nach Maßgabe des im Wasser vorhandenen Sauerstoffs ihren Sauerstoffbedarf am vollständigsten zu decken vermögen, während die darunter liegenden Zellen um so schlechter mit Sauerstoff versorgt werden, je weiter sie von der Oberfläche entfernt sind. Um so ungünstiger gestalten sich diese Verhältnisse und um so geringer wird damit der Gesamt-Sauerstoffverbrauch der Tiere, je sauerstoffärmer das Wasser ist, in dem die Tiere leben.

Umgekehrt ist bei erhöhten Sauerstoffdrucken ein solcher Überschuß von Sauerstoff vorhanden, daß derselbe in ausreichendem Maße selbst bis zu den am weitesten nach innen gelegenen Zellen hin diffundiert. Damit wird sämtlichen Zellen zur völligen Deckung ihres Sauerstoffbedarfs verholfen, was natürlich eine Steigerung des Gesamt-Sauerstoffverbrauches der Tiere zur Folge hat.

Mit dieser Vorstellung vereint sich auch die Tatsache, daß der Sauerstoffkonsum von einem gewissen, für jedes Tier bestimmten Drucke ab nicht mehr steigt, sondern sich ein konstanter Verbrauch einstellt, selbst wenn der Sauerstoffdruck weiter erhöht wird. Dieser Fall tritt eben ein, wenn, um mich schematisch auszudrücken, auch die am tiefsten gelegenen Zellen noch ihren maximalen Sauerstoffbedarf erlangen. Über dieses Maximum hinaus vermag keine Zelle mehr Sauerstoff zu verarbeiten. Dies wurde an den Seeigeleiern direkt gezeigt und erklärt sich mit den schon oben zitierten Worten Pfeffers.

Es ist klar, daß, wie wir uns ausdrückten, die nach dem Innern zu gelegenen Zellen sich nun nicht stetig in einem mehr oder weniger anormalen, d. h. asphyktischen Zustande befinden können. Vielmehr dürften die Zellen der in Frage kommenden Tiere die Fähigkeit haben, ihren Stoffwechsel so zu regulieren, daß derselbe je nach der Menge des verfügbaren Sauerstoffs entweder mehr in oxybiotischer oder mehr in anoxybiotischer Richtung verläuft. Für die Actinien müssen wir z. B. annehmen,

daß selbst in normalem Seewasser ein Teil der Zellen anaerob arbeitet; andernfalls wäre schwerlich zu erklären, warum die Tiere bei Vergrößerung des normalen Sauerstoffdrucks ihren Konsum noch erhöhen. Desgleichen wäre es ohne die Annahme anaerober Stoffwechselprozesse wohl unmöglich, sich vorzustellen, wie z. B. Sipunculus tagelang in fast ganz sauerstofffreiem Wasser zu leben vermag.

Eine weitere Stütze der eben entwickelten Verhältnisse glaube ich auch in den folgenden Versuchen zu sehen. Sie sollten Aufschluß geben über den Einfluß, den eine Temperatursteigerung auf den Sauerstoffmehrkonsum genannter Tiere haben würde, d. h. nachdem zunächst festgestellt worden war bei einer Temperatur von ca. 15°, wieviel die Tiere Sauerstoff mehr konsumieren, wenn sie anstatt in normalem Wasser in Wasser mit ungefähr dem doppelten Sauerstoffdruck atmeten, wurde hierauf die gleiche Bestimmung bei einer ungefähr 10° höheren Temperatur wiederholt. Wie sich herausstellte, erfuhr der Sauerstoffmehrkonsum keine irgend erkennbare Änderung. Dies ist verständlich, wenn entsprechend den obigen Erörterungen der Mehrkonsum an Sauerstoff in einem sauerstoffreicheren Wasser tatsächlich nur auf der tieferen Eindiffusion in die Gewebe beruht. Bekanntlich ändert sich die Diffusionsgeschwindigkeit von Gasen in Flüssigkeiten (Gewebsflüssigkeit) nur minimal mit der Temperatur. Dieses war ja der einzige Faktor, der in diesem Falle in Frage kam. Die ganze Atmung wird sozusagen nur auf ein höheres Niveau gehoben, da selbstverständlich die erhöhte Temperatur die Atmung an und für sich steigert, und zwar, wie auch die Tabellen zeigen, entsprechend dem Temperaturgesetz.

Versuchsreihe 28.
Actinia aequina: 5 Tiere in Gefäß von 650 ccm Inhalt.

Datum	Dauer	O-Gehalt d. W.	O-Verbrauch	Bemerkungen
4. Dez.	10^{30}–12	27,80	3,00	t = 15,3°
				Gefäß mit Tieren langsam auf
	1^{40}–3^{10}	27,60	7,30	22,5° gebracht
	3^{22}–4^{52}	41,30	11,00	t = 22,5°
				Tiere über Nacht wieder in
5. „	9^{20}–10^{50}	27,80	3,20	Wasser von 15,3°
	12^{12}–1^{42}	27,20	6,70	Langsam erwärmt auf 22,5°
	1^{52}–3^{22}	43,20	11,10	t = 22,5°
	3^{25}–5^{05}	58,90	13,60	„

Versuchsreihe 28 (Fortsetzung).

Datum	Dauer	O-Gehalt d. W.	O-Verbrauch	Bemerkungen
				Tiere nunmehr 2 Tage in fließendem Wasser von 22,5° gehalten
8. Dez.	10^{55}–11^{25}	27,30	3,00	t = 22,5°
	12^{37}–2^{07}	42,40	4,90	„
	2^{12}–3^{42}	40,50	4,80	„
				Kontinuierlich auch über Nacht in fließendem Wasser von 22,5°
9. „	10^{10}–11^{40}	27,70	3,30	t = 22,5°
	11^{45}–1^{15}	41,00	5,00	„
	1^{25}–2^{55}	39,60	[6,50]	
				Kontinuierlich bis zum Versuch am nächsten Morgen
10. „	10^{15}–11^{45}	28,30	3,30	bei 22,5°
	11^{45}–1^{15}	41,00	5,00	t = 22,5°
11. „	10^{19}–11^{49}	25,00	3,30	Einen weiteren Tag bei 22,5°. Die Tiere wurden nun langsam in kühleres Wasser, t = 14,8°, gebracht
	2^{00}–3^{30}	26,30	1,90	t = 14,8° } Der O-Konsum ist
	3^{30}–5^{00}	26,10	2,10	„ } tiefer als am Beginn der
	5^{00}–6^{30}	26,20	2,00	„ } Versuchsreihe (4. und 5. Dez.) bei gleicher Temp.
12. „	9^{51}–11^{23}	26,60	1,26	t = 14,7°
	11^{30}–1^{00}	26,00	1,80	„
	1^{15}–2^{45}	26,10	1,70	„
				Tiere 2 weitere Tage in Wasser
14. „	10^{11}–11^{48}	27,10	1,10	von 14,5°
	11^{50}–1^{20}	26,30	1,90	
	1^{30}–3^{00}	26,50	1,70	
				Tiere jetzt mit Fischfleisch gefüttert u. am folgenden Morgen
15. „	11^{33}–1^{03}	29,10	2,60	O-Konsum bestimmt
	1^{07}–2^{37}	25,90	3,20	t = 14,2°
16. „	11^{43}–1^{13}	28,50	3,30	Nochmal gefüttert
	1^{15}–2^{45}	28,50	4,40(?)	
	2^{55}–4^{25}	59,40	9,40	

Bemerkung: Auffällig war, daß nach ca. 3tägigem Aufenthalt der Tiere in höher temperiertem Wasser (t = 22,5°) der Sauerstoffkonsum in Wasser von normalem Sauerstoffgehalt absank (vgl. 8. bis 11. Dez.), so daß er etwa die Höhe wie in Wasser von 14° annahm. Anfangs glaubte ich, daß es sich möglicherweise um eine Art Anpassung an die höhere Temperatur handeln könne. Daß dies nicht der Fall war, geht daraus hervor, daß die Tiere beim Zurückbringen in kühleres Wasser von 14,8° (11. Dez.) in ihrem Sauerstoffkonsum zurückgehen, also unter den, den sie am Anfang (4. Dez.) zeigten bei der gleichen Temperatur. Diesen niederen Sauerstoffverbrauch behalten sie auch bei (12. bis 14. Dez.). Nachdem die Tiere dann gefüttert wurden, stieg der Sauerstoffkonsum wieder auf die alte Höhe. Möglicherweise hatte der lange Aufenthalt bei höherer

Temperatur, zu dem noch die Experimente unter höherem Sauerstoffdruck kamen, einen Zustand der Erschöpfung hervorgerufen.

Während der Korrektur wurde ich auf eine interessante Mitteilung von A. Montuori aufmerksam (Centralbl. f. Physiol. 20, Nr. 8). Er beobachtete, daß Seetiere, die ganz allmählich auf höhere Temperatur gebracht wurden, ihren Sauerstoffkonsum nicht etwa erhöhen, gemäß dem Temperaturgesetz, sondern ihn herabsetzen, und zwar sogar unter die Norm. Dies würde mit oben genannten Beobachtungen übereinstimmen.

Versuchsreihe 29.

Anemonia sulcata: 5 Tiere in Gefäß von $1^1/_2$ l.

Datum	Dauer	O-Gehalt d. W.	O-Verbrauch	Bemerkungen
10. Dez.	9^{25}–10^{55}	27,80	3,80 (?)	t = 14,5°
	11^{28}–12^{58}	27,80	5,00	„
	2^{08}–3^{38}	27,80	5,20	„
				Tiere langsam auf
11. „	11^{30}–1^{00}	27,90	9,90	t = 22,5° erwärmt
	1^{10}–2^{40}	27,70	8,50	t = 22,5°
	2^{50}–4^{20}	27,60	8,80	„
				Kontinuierlich bis zum nächst.
				Morgen in fließ. warm. Wasser
12. „	10^{23}–11^{53}	28,50	9,50	t = 22,5°
	12^{05}–1^{35}	28,50	9,20	„
	3^{45}–5^{15}	44,70	11,90	„
				Bis zum folgenden Versuch
13. „	10^{47}–12^{17}	28,00	9,00	bei t = 22,5°
	12^{35}–2^{05}	50,30	12,30	t = 22,5°
	2^{25}–3^{55}	44,80	12,80	„
	4^{08}–5^{38}	27,30	8,90	„
				Fortgesetzt bei t = 22,5°
14. „	10^{27}–11^{57}	28,10	9,20	t = 22,5°
				Fortgesetzt bei t = 22,5°
15. „	9^{40}–11^{10}	28,80	9,00	t = 22,5°
				Tiere nunmehr in Wasser von
				14° bis zum nächsten Tag
16. „	9^{30}–11^{00}	28,30	3,70	t = 14°
	11^{05}–12^{35}	28,30	3,90	„
	12^{45}–2^{15}	52,30	5,80	„
	2^{30}–4^{00}	48,80	4,70	„
	4^{00}–5^{30}	28,30	3,10	„

Versuchsreihe 30.

Sipunculus nudus: 2 Exemplare in 500 ccm Wasser.

Datum	Dauer	O-Gehalt d. W.	O-Verbrauch	Bemerkungen
1. Dez.	12^{18}–1^{18}	28,60	7,20 (?)	t = 22,5° Tiere noch etwas
	1^{28}–2^{28}	28,10	6,50	„ bewegt
	2^{32}–3^{32}	27,70	6,00	„
	3^{45}–4^{45}	43,40	10,00	„

Versuchsreihe 30 (Fortsetzung).

Datum	Dauer	O-Gehalt d. W.	O-Verbrauch	Bemerkungen
				Tier seit letztem Versuch in Wasser von $t = 14{,}5^0$
2. Dez.	9^{25}–10^{25}	28,60	3,20	$t = 14{,}5^0$
	11^{45}–12^{45}	46,10	6,30	„
	12^{47}–1^{47}	45,60	6,80	„
	1^{56}–2^{56}	51,60	6,30	„
	3^{13}–4^{13}	28,20	3,50	„
3. „	9^{27}–10^{27}	28,10	3,60	$t = 14^0$
	10^{27}–11^{27}	28,10	3,60	„
4. „	10^{08}–11^{08}	27,80	4,70	Tier langsam auf $t = 22{,}5^0$
	11^{08}–12^{08}	27,30	5,00	$t = 22{,}5^0$
	12^{20}–1^{20}	44,00	8,60	„
	1^{35}–2^{35}	43,50	9,30	„
	2^{45}–3^{45}	61,5	? (verloren)	„
	4^{05}–5^{05}	31,20	5,60	„

Versuchsreihe 31.

Sipunculus nudus: 4 Exemplare in 750 ccm Wasser.

Datum	Dauer	O-Gehalt d. W.	O-Verbrauch	Bemerkungen
30. Nov.	11^{40}–12^{10}	29,00	2,10	$t = 13{,}5^0$
	12^{20}–12^{50}	29,00	2,90	„
	1^{30}–2^{00}	29,00	2,30	„
				Tiere langsam auf $t = 22{,}5^0$ gebracht
	2^{55}–3^{25}	28,75	5,80	(zu starke Bewegung) $t = 22{,}5^0$
	3^{25}–3^{55}	28,75	4,20	$t = 22{,}5^0$
	3^{58}–4^{28}	28,75	4,80	„
1. Dez.	9^{22}–9^{52}	28,60	1,50	$t = 14{,}5^0$
	10^{07}–10^{37}	26,60	2,00	„
	12^{05}–12^{35}	50,10	3,20	„
	12^{53}–1^{23}	51,00	2,90	„
	3^{48}–4^{18}	28,05	1,30	„
2. „	9^{28}–9^{58}	27,90	1,30	$t = 14{,}5^0$
				Langsam auf 22,5° gebracht
	10^{23}–10^{53}	27,90	4,50	Konsum zu hoch. Tiere bewegen sich stärker; $t = 22{,}5^0$
	10^{53}–11^{23}	27,90	4,50	
	11^{28}–11^{58}	27,90	3,60	$t = 22{,}5^0$
	12^{08}–12^{38}	45,10	5,00	„
	12^{58}–1^{28}	53,40	4,60	„
	1^{40}–2^{10}	40,50	5,50 (?)	„
	2^{20}–2^{50}	49,10	4,70	„
2. „	3^{20}–3^{50}	27,50	3,90	$t = 22{,}5^0$
	4^{03}–4^{33}	26,60	3,00	„
	4^{31}–5^{07}	26,60	3,00	„

Versuchsreihe 31 (Fortsetzung).

Datum	Dauer	O-Gehalt d. W.	O-Verbrauch	Bemerkungen
3. Dez.	9^{21}—9^{57}	27,90	1,90	Tiere jetzt in Wasser von t = 15° gebracht
	10^{02}—10^{32}	27,90	2,00	t = 15° „

Bemerkung: Auch hier sinkt mit dem fortgesetzten Aufenthalt der Tiere in höherer Temperatur der Sauerstoffkonsum im allgemeinen etwas ab, wie das bei Actinia in der Anmerkung erwähnt wurde.

IV.

Es wurde im vorstehenden versucht, den wechselnden Sauerstoffkonsum der in der ersten Gruppe zusammengestellten Tiere sozusagen in rein mechanischer Weise zu erklären. Da es unter den pelagischen Tieren Organismen gibt, die außerordentlich zarte Gewebe besitzen, vermutete ich, daß bei ihnen keine Änderung des Sauerstoffkonsums bei zunehmenden Drucken zu beobachten sein würde, in der Meinung, der Sauerstoffdruck des normalen Wassers würde bereits hinreichen, die dünnen Gewebe so vollständig mit Sauerstoff zu durchdringen, um allen Zellen den maximalen Sauerstoffbedarf zuzuführen. Die folgenden Versuche an Pelagia und Carmarina zeigen in der Tat, daß eine Erhöhung des Sauerstoffdrucks bei diesen Tieren keine vermehrte Sauerstoffaufnahme zur Folge hat.

Die meisten pelagischen Tiere sind so delikat, daß sie nur stundenlang in einigermaßen normalem Zustande im Aquarium zu halten sind. Die Werte für den Sauerstoffkonsum z. B. bei Pelagia beginnen sehr bald abzusinken, so daß längere Serienversuche ausgeschlossen sind, in noch stärkerem Maße gilt dies für Carmarina. Auch muß man sich vor Fehlern schützen, insofern die Tiere leicht Schleim absondern bei unzarter Behandlung, wodurch die Sauerstofftitrationen illusorisch werden.

Versuchsreihe 32.

1.

Pelagia noctiluca: 2 Exemplare in 2 l Wasser, t = 15°, Versuchsd. 1 St.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
29,20	2,00
46,70	1,70
30,50	1,90
43,00	1,60

2.

3 Tiere in 1,5 l Wasser, t = 15°. Versuchsdauer 45 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
29,00	3,80
63,60	2,60
29,20	1,90

3.

2 Tiere in 1,5 l Wasser, t = 14,5°, Versuchsdauer 45 Min.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
27,00	1,70
45,60	1,70
27,00	1,50
15,80	0,70
64,00	1,00
28,00	0,80

4.

2 Tiere in 1,5 l Wasser, t = 15°, Versuchsdauer 1 Stunde.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
29,20	2,80
52,90	2,40
30,50	1,00

Versuchsreihe 33.

Carmarina hastata: 2 Tiere in 1 l Wasser, t = 15°, Versuchsdauer 1 Stunde.

Die respiratorische Aktivität sinkt sehr rasch ab.

O-Gehalt des Wassers	O-Konsum
27,90	3,90
55,80	2,90
28,20	1,00

Anhang.

Schon eingangs wurde erwähnt, daß bei der behandelten Fragestellung lediglich die Größe des Sauerstoffkonsums ins Auge gefaßt wurde, von einer gleichzeitigen Bestimmung der ausgeschiedenen Kohlensäure dagegen experimenteller Schwierigkeiten wegen vor der Hand abgesehen wurde.

Trotzdem möchte ich wenigstens einige an Sipunculus gemachte Versuche anführen, in denen versucht wurde, den Gasaustausch vollständig, d. h. sowohl Sauerstoff als Kohlensäure zu bestimmen. Während die Werte für Sauerstoff als absolut exakt gelten müssen, können wie gesagt die Zahlen für die Kohlensäure nicht auf völlige Genauigkeit Anspruch machen. Die Zunahme der Kohlensäure während eines Respirationsversuchs ist zu klein im Verhältnis zu der bereits im Seewasser vorhandenen Kohlensäure.

Was die Versuche trotz der etwas unsicheren Kohlensäurebestimmungen illustrieren sollen, dürfte genügend zum Ausdruck kommen. Während die Werte für den Sauerstoffkonsum sich bis um das 10fache ändern, bleibt die Kohlensäureausscheidung verhältnismäßig konstant. Auf keinen Fall erfolgt also bei steigendem Sauerstoffkonsum ein proportionales Ansteigen der eliminierten Kohlensäure. Auch diese Tatsache scheint uns zugunsten der oben dargelegten Anschauung zu

sprechen. Würde z. B. die Kohlensäureausscheidung in demselben Maße anwachsen wie die Sauerstoffaufnahme, so müßten wir eine Steigerung der gesamten Verbrennungen in der Zelle annehmen, wie solche nur als Folge von Temperaturerhöhungen bekannt sind.

Versuchsreihe 34.
Sipunculus nudus.

Im folgenden sind die Resultate dreier Versuchsserien A., B., C. tabellarisch zusammengestellt. Zu jeder Reihe wurden neue, und zwar jedesmal 5 Tiere benutzt und ihr Gaswechsel während einer Periode von 3 Stunden in einer Wassermenge von 2 l (Temp. 17°) bestimmt, und zwar unter den aus der Tabelle ersichtlichen wechselnden Sauerstoffdrucken. Sauerstoff und Kohlensäureausgaben sind in Kubikzentimetern (760 mm 0°) pro Liter gemacht.

An der Versuchsanordnung wurde nichts geändert. Der Sauerstoff wurde nach Winkler titriert. Die Kohlensäure wurde durch Auskochen der mit Schwefelsäure angesäuerten Wasserprobe (460 ccm) unter Durchleitung eines kohlensäurefreien Luftstromes bestimmt. Die Kohlensäure wurde in titriertem, in einen Peligotschen Rohre befindlichen Barytwasser zurückgehalten und ein aliquoter Teil des letzteren mit $^n/_{10}$-HCl zurücktitriert.

	O-Gehalt des Wassers	CO_2-Gehalt des Wassers	O-Konsum	CO_2-Ausscheidung	
A. 1	5,17	58,07	2,46	3,58	
2	1,31	58,07	0,46	5,37	(Fehler?)
3	1,36	59,16	0,43	1,46	
B. 1	1,13	57,22	0,41	3,52	
2	0,81	59,16	0,29	2,92	
3	5,41	58,80	1,73	2,55	
C. 1	5,47	60,25	1,69	2,55	
2	11,29	59,88	2,86	0,73	(?)
3	11,46	60,98	2,60	1,80	
4	5,55	60,20	1,72	1,83	
5	8,80	60,14	2,47	2,55	

Über die Hemmung der Giftwirkung von Hydroxylionen auf das Seeigelei mittels Cyankalium.

Von

Jacques Loeb.

(Eingegangen am 3. Mai 1910.)

I. Vor vier Jahren[1]) veröffentlichte ich die Tatsache, daß die Wirkung hypertonischer Lösungen auf das befruchtete und unbefruchtete Seeigelei sowohl mittels Sauerstoffentziehung als auch durch Zusatz von Cyankalium gehemmt werden kann. Sowohl die entwicklungserregende Wirkung einer solchen Lösung auf das unbefruchtete Ei als auch die zerstörende Wirkung auf das befruchtete und unbefruchtete Ei wird durch Hemmung der Oxydationen (sei es durch Sauerstoffentziehung oder durch Unterdrückung der Oxydationen mittels Cyankalium) unmöglich gemacht resp. erheblich verringert. Ich habe schon früher darauf hingewiesen, daß die Wirkung der Hydroxylionen auf das Ei mit den Oxydationen in demselben zusammenhängt.[2]) Das regte die Vermutung an, daß auch die Giftwirkung der Hydroxylionen durch Cyankalium resp. durch Sauerstoffentziehung beseitigt werden könne. Ich habe bisher nur eingehendere Versuche mit Cyankalium angestellt, und diese haben meine Erwartung in vollem Maße bestätigt.[3]) Ich teile diese Versuche hier mit, da dieselben für die Theorie der Entwicklungserregung von Bedeutung sind.

Zur Methode der Versuche sei folgendes bemerkt. Die befruchteten oder unbefruchteten Eier von Strongylocentrotus

---

[1]) Pflügers Archiv 113, 487, 1906.

[2]) Pflügers Archiv 73, 422, 1898; 118, 30, 1907 u. a.

[3]) Daß Sauerstoffmangel ebenso wirkt, geht aus früheren Versuchen hervor. Diese Zeitschr. 2, 103, 1906.

purpuratus wurden durch dreimalges Waschen in einer strikt neutralen m/2-Lösung von NaCl von allen Spuren Seewasser befreit. Dann wurden sie in eine Mischung von 50 ccm einer 0,54 m-Lösung von NaCl + 1,1 ccm m/2-KCl gebracht, zu der die gewünschte Menge NaHO zugesetzt war. Die alkalischen Lösungen wurden stets paarweise hergestellt, und einer derselben wurde 0,5 ccm einer $^1/_{10}$ %igen Lösung von KCN (zu je 50 ccm) zugefügt. Diese kleine Menge KCN reicht aus, um die Entwicklung des Eies zu hemmen; sie reicht auch aus, um die Giftwirkung des Alkalis zu hemmen (obwohl durch den Zusatz von KCN die Konzentration der Hydroxylionen in der Lösung erhöht wird). Die Temperatur war ungefähr 15° C.

II. Versuche an unbefruchteten Eiern. Gewaschene, unbefruchtete Eier wurden in folgende Lösungen verteilt:

1. 50 ccm 0,54 m-NaCl + 1,0 ccm m/10-NaOH,
2. 50 „ 0,54 „ + 1,0 „ „ + 0,5 ccm $^1/_{10}$ % KCN.

Nach verschiedenen Intervallen wurden die Eier in normales Seewasser übertragen. Es stellte sich heraus, daß die nach 5 Stunden aus Lösung 1 in Seewasser übertragenen Eier nach Samenzusatz sich noch zu entwickeln imstande waren. Die Eier aber, die 8 Stunden in der hyperalkalischen Lösung gewesen waren, waren alle zerfallen, und kein Ei war mehr imstande, sich nach Samenzusatz zu entwickeln. Die Eier dagegen, die in der cyankaliumhaltigen Lösung gewesen waren, waren nach 72 Stunden noch intakt und konnten um diese Zeit, nach der Übertragung in Seewasser, noch mit Samen befruchtet werden und sich entwickeln. Der Zusatz von KCN hatte also die Giftwirkung der Hydroxylionen aufgehoben.

Da man denken könnte, daß das KCN in diesen Versuchen vermöge seines Gehaltes an K wirkt, so wurden weitere Versuche in der Weise angestellt, daß beide Lösungen KCl erhielten, aber die Lösung, die das Cyankalium enthielt, absichtlich einen geringeren Betrag von KCl erhielt als die andere, cyankaliumfreie Lösung. Das Resultat blieb aber dasselbe, wie der nachstehende Versuch lehrt.

Unbefruchtete Eier von Pupuratus wurden in folgende zwei Lösungen verteilt:

1. 50 ccm 0,54 m-NaCl + 1,1 ccm m/2-KCl + 1,0 ccm m/10-NaHO,

2. 50 ccm 0,54 m-NaCl + 0,9 ccm m/2-KCl + 1,0 ccm m/10-NaHO + 0,5 ccm $^1/_{10}$% KCN.

Die in Lösung 1 befindlichen Eier waren in etwa 6 Stunden zerfallen. Die in der cyankaliumhaltigen Lösung 2 befindlichen Eier waren dagegen nach 41 Stunden — länger war der Versuch nicht fortgesetzt worden — noch intakt, d. h. sie konnten nach dieser Zeit, in normales Seewasser übertragen, noch befruchtet werden und sich entwickeln.[1])

Ich habe diese Experimente so oft mit demselben Erfolg wiederholt, daß ich behaupten darf, daß es sich um nie versagende Demonstrationsversuche handelt.

III. Versuche an befruchteten Eiern. Ich habe schon früher erwähnt, daß das befruchtete Seeigelei rascher durch Alkali zerstört wird als das unbefruchtete. Es ist deshalb nicht überraschend, daß man, um die Hemmung der Giftwirkung der Hydroxylionen durch KCN für das befruchtete Ei nachzuweisen, niedrigere Konzentrationen der Hydroxylionen anwenden muß, als für das unbefruchtete Ei. Wenn man das berücksichtigt, so fallen die Versuche für das befruchtete Ei ebenso schlagend aus, wie für das unbefruchtete.

Die frisch befruchteten Eier eines Seeigels wurden gewaschen und in die folgenden beiden Lösungen übertragen:

1. 50 ccm NaCl + 1,1 ccm KCl + 0,2 ccm m/10-NaHO,

2. 50 „ „ + 1,1 „ „ + 0,2 „ „ + 0,5 ccm $^1/_{10}$% KCN.

Es ist zu bemerken, daß die Eier oft erst nach der Übertragung aus solchen hyperalkalischen Lösungen in normales Seewasser zerfallen. Die Resultate dieser Versuche wurden daher nach der Übertragung der Eier in normales Seewasser festgestellt.

Schon nach $2^1/_2$ Stunden waren die Eier in Lösung 1 fast alle zerstört (cytolysiert). Nach $3^1/_2$ Stunden war kein Ei in Lösung 1 am Leben oder lebensfähig. Die Eier dagegen, die in der cyankaliumhaltigen Lösung 2 waren, waren noch nach

[1]) Man darf die Eier nicht sofort nach der Übertragung in Seewasser befruchten, sondern erst 1 bis 2 Stunden später.

22 Stunden fast alle am Leben, und die Eier, die um diese Zeit in normales Seewasser übertragen wurden, entwickelten sich zur Hälfte zu schwimmenden Larven. Diese Larven sind nicht sehr schön, aber das ist, wie ich schon in früheren Arbeiten auseinandergesetzt habe, die Wirkung der langen Hemmung der Oxydationen.[1])

Dieser Versuch, der mit kleinen Modifikationen oft wiederholt wurde und stets in derselben Weise ausfiel, zeigt, daß auch für das befruchtete Ei die Hemmung der Giftwirkung der Hydroxylionen ebenso schlagend nachgewiesen werden kann, wie für das unbefruchtete Ei.

Wählt man niedrigere Konzentrationen der Hydroxylionen als im angeführten Versuche, beispielsweise 0,1 ccm m/10-NaHO zu 50 ccm der NaCl-Lösung, so läßt sich die entgiftende Wirkung einer kleinen Menge von KCN auch noch sehr schön nachweisen. Nimmt man aber größere Mengen von NaHO, so ist die entgiftende Wirkung von KCN für das befruchtete Ei sehr gering, wie folgendes Beispiel zeigt. Frisch befruchtete Eier wurden in folgende Lösungen verteilt:

1. 50 ccm NaCl + 1,1 ccm KCl + 0,4 ccm m/10-NaHO,
2. 50 „ „ + 1,1 „ „ + 0,4 „ „ + 0,5 ccm $^1/_{10}$% KCN.

Nach $2^1/_2$ Stunden waren die Eier in Lösung 1 praktisch alle cytolysiert. In Lösung 2 waren um diese Zeit noch viele Eier am Leben. Nach $3^1/_2$ Stunden waren auch in Lösung 2 nur wenige mehr am Leben, und nach $4^1/_2$ Stunden waren auch in der cyankaliumhaltigen Lösung alle tot. Die lebensrettende Wirkung des KCN war also noch nachweisbar, sie war aber von einer viel geringeren Größenordnung als im Falle der Anwendung kleinerer Mengen von NaHO.

Auch die Versuche über die Hemmung der Giftwirkung der Hydroxylionen auf das befruchtete Seeigelei habe ich oft mit demselben Erfolge wiederholt.

IV. Die Wirkung des Alkalis auf das befruchtete und unbefruchtete Seeigelei. Was bedingt den in den voraufgehenden zwei Abschnitten geschilderten Unterschied in der Wirkung des Alkalis auf das befruchtete und unbefruchtete Ei?

---

[1]) J. Loeb, diese Zeitschr. 1, 199, 1906.

Bei allen solchen Fragen liegt die Schwierigkeit vor, daß wir die chemischen Wirkungen auf die Zelle im allgemeinen nur indirekt erschließen können. In bezug auf die Frage nach der Wirkung des Alkalis sind wir aber in einer günstigeren Lage, indem wir farbige Basen anwenden können, beispielsweise Neutralrot.

Wie ich schon vor 4 Jahren mitteilte, erlaubt ein einfacher Versuch, den Unterschied im Verhalten der befruchteten und unbefruchteten Eier gegen Neutralrot schlagend zu demonstrieren.[1]) Wenn man zu 50 ccm Seewasser 1 Tropfen einer m/100-Lösung von Neutralrot zufügt, und unbefruchtete und befruchtete Eier von Purpuratus gleichzeitig in diese Lösung bringt, so nehmen beide Arten von Eiern eine rote Färbung an, ohne daß ein Unterschied im Verhalten beider Klassen von Eiern wahrzunehmen wäre. Überträgt man aber die Eier nach etwa $^1/_2$ Stunde in normales Seewasser, das frei von Neutralrot ist, so beobachtet man allmählich eine charakteristische Änderung. Die unbefruchteten Eier werden allmählich mehr und mehr entfärbt, während die befruchteten Eier immer röter werden. Die Erklärung für diese Erscheinung ist die folgende. In den befruchteten Eiern erfährt das Neutralrot eine chemische Bindung, wodurch es außer stande ist, aus dem Ei herauszudiffundieren. In den unbefruchteten Eiern aber bleibt das Farbstoffmolekül unverändert enthalten, und es kann wieder aus dem Ei herausdiffundieren. Bringt man also die Eier aus der farbstoffhaltigen Lösung in Seewasser, das frei von Farbstoff ist, so wird sich das in den unbefruchteten Eiern enthaltene Neutralrot dem Verteilungsgleichgewicht entsprechend zwischen unbefruchteten Eiern und Seewasser verteilen. Aus dem Seewasser muß es in die befruchteten Eier diffundieren, da in den letzteren infolge der chemischen Bindung des Neutralrots der osmotische Druck desselben gleich Null bleibt. Das in die befruchteten Eier diffundierende Neutralrot wird, wenn seine Masse nicht zu groß ist, wieder chemisch gebunden. Auf diese Weise wird alles Neutralrot allmählich aus den unbefruchteten Eiern in die befruchteten gelangen müssen.

---

[1]) J. Loeb, diese Zeitschr. 2, 35, 1906.

Was die Art der Bindung des Neutralrots im befruchteten Ei betrifft, so ist die einfachste Annahme, daß es mit einer Säure im befruchteten Ei ein Salz bildet. Die Annahme würde es auch verständlich erscheinen lassen, daß das Neutralrot nicht mehr aus dem befruchteten Ei herausdiffundiert (vorausgesetzt, daß nicht zu viel Neutralrot vorhanden ist); es ist ja bekannt, daß Farbstoffbasen leichter durch das Protoplasma diffundieren als Farbstoffsalze.

Ich vermute nun, daß farblose Basen, z. B. NaHO, sich ebenso verhalten, wie das Neutralrot. Aber während das NaHO im befruchteten Ei mit einer im letzteren gebildeten Säure ein Salz bildet, bleibt das NaHO im unbefruchteten Ei wesentlich nur in Lösung erhalten. Wenn diese Annahme richtig wäre, so sollte sich der Nachweis bringen lassen, daß Neutralrot imstande ist, die Rolle von NaHO für das befruchtete Ei zu übernehmen. Dieser Nachweis gelingt in der Tat. In einer früheren Arbeit habe ich gezeigt, daß, wenn man alle Salze, die im Seewasser enthalten sind, in der richtigen Konzentration löst, die Konzentration der HO-Ionen aber so niedrig wählt, daß die Lösung mit Neutralrot rot ist, aber sehr nahe dem Umschlagspunkte liegt, kein befruchtetes Seeigelei in einer solchen Lösung sich zur Larve zu entwickeln vermag.[1]) Die Eier bleiben in den ersten Furchungsstadien stehen. Fügt man aber zu 50 ccm einer solchen Lösung 0,2 bis 0,8 ccm m/100-NaHO hinzu, so entwickeln sich die meisten resp. alle Eier zu Larven.

Ich finde nun, daß in diesem Falle das Neutralrot imstande ist, das NaHO zu ersetzen. Ein derartiger Versuch soll als Beispiel angeführt werden.

Es wurde eine Mischung von m/2-NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ in dem Verhältnisse hergestellt, in dem diese Salze im Seewasser enthalten sind. Außerdem wurde eine kleine Menge Na_2SO_4 zugesetzt. Die Lösung gab gerade eine rote Färbung mit Neutralrot. Zu je 50 ccm dieser Lösung wurden 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ccm einer frisch bereiteten m/100-Lösung von Neutralrot zugefügt. Eine Portion frisch befruchteter Eier wurde nach dreimaligem Waschen in diese Lösungen verteilt. In der ersten Lösung, die frei von Neutralrot war, entwickelte sich

[1]) J. Loeb, diese Zeitschr. 2, 88, 1906.

kein Ei zur Larve, 40% der Eier furchten sich nicht einmal, und die übrigen erreichten nur das Zwei- und Vierzellenstadium. In der Lösung 2, mit 0,2 ccm Neutralrot, furchten sich alle Eier, aber nur 10% derselben entwickelten sich zu schwimmenden Larven. Mit 0,4 ccm Neutralrot bildeten sich 50% schwimmende Larven, mit 0,6 ccm bildeten sich 60%, und mit 0,8 ccm Neutralrot entwickelten sich praktisch alle Eier zu schwimmenden Larven.

Diese Entwicklung fand aber nur bei den Eiern statt, die mit etwa 4 ccm der Lösung im Uhrschälchen gehalten wurden. Die Eier, die im Hauptgefäß gehalten wurden, entwickelten sich nicht so weit. Das kann zwei Gründe haben. Im Uhrschälchen war die Sauerstoffversorgung eine bessere als im Hauptgefäß, da in letzterem die Eier von einer viel höheren Wasserschicht bedeckt waren, welche die Diffusion des Sauerstoffs verzögerte. Die zweite Möglichkeit war die, daß im Uhrschälchen die Menge von Neutralrot, die die Eier aufnehmen konnten, beschränkt war. Daß der letztere Umstand von Bedeutung sein kann, wird dadurch bewiesen, daß, wenn man die Eier nach etwa 6 Stunden aus den Lösungen mit Neutralrot in die identischen Lösungen, aber ohne Neutralrot, überführt, sie imstande sind, sich zu Larven zu entwickeln.

Diese Versuche, die sehr oft mit demselben Ergebnis wiederholt wurden, beweisen, daß Neutralrot in der Tat die Rolle von NaHO im unbefruchteten Ei übernehmen kann, und daß wir deshalb berechtigt sind, anzunehmen, daß NaHO denselben Unterschied im Verhalten auf das befruchtete und unbefruchtete Ei zeigt, den wir für Neutralrot haben nachweisen können.

Diese Tatsachen legen den Gedanken nahe, daß die stärkere Wirkung von NaHO auf das befruchtete Ei damit zusammenhängt, daß in letzterem die Base chemisch gebunden wird, vermutlich in der Form eines Salzes. Das dürfte im Lichte von Stieglitz' Theorie der Katalyse durch Salzbildung verständlich werden. Für die Katalyse der Ester durch Säure hat Stieglitz den Nachweis geführt, daß der Ester als schwache Base fungiert, und daß nicht das Estermolekül, sondern nur das Esterion sich spaltet. Die katalytische Wirkung der Säure beruht darauf, daß dieselbe mit der schwachen Esterbase ein Salz bildet, das viel stärker elektrolytisch dissoziiert ist als die

Base. Infolgedessen ist die aktive Masse der Esterionen, die der Zersetzung fähig sind, vermehrt, und die Reaktion ist beschleunigt. In gleicher Weise können wir annehmen, daß die Entwicklung des Seeigeleies zur Voraussetzung hat, daß eine schwache Säure im Ei zersetzt resp. oxydiert wird. Tritt nun diese Zersetzung resp. Oxydation im Anion der Säure, aber nicht im undissoziierten Molekül ein, so ist es verständlich, warum die Konzentration der HO-Ionen in der umgebenden Lösung eine gewisse Höhe erreichen muß, wenn das Ei sich entwickeln soll. Wird die Konzentration der Hydroxylionen zu hoch, so wird das Ei zerstört, weil die katalytische Wirkung des Alkalis zu stark wird. Eine kleine Dosis KCN hemmt diese Katalyse, und so wird es verständlich, wie es kommt, daß KCN die Entwicklung des befruchteten Eies sowohl wie die giftige Wirkung eines Überschusses von NaHO hemmt.

Meine früheren Versuche weisen darauf hin, daß KCN die Oxydationen im Ei hemmt. Wir müssen daran denken, daß es sich auch bei dem Schutz gegen Alkalivergiftung um die Hemmung von Oxydationen durch KCN handelt. Da ich aber diesen Umstand durch direkte Versuche noch sicherer festzustellen gedenke, so brauchen wir denselben hier nicht weiter zu diskutieren.

Wie kommt es aber, daß NaHO das unbefruchtete Ei zerstört? Daß es auf das unbefruchtete Ei schwächer wirken muß, als auf das befruchtete Ei, ist klar, da ja das unbefruchtete Ei wenig oder kein Alkali bindet, also wenig oder keine Säure enthält, die der Spaltung resp. Oxydation verfällt. Unter diesen Umständen sollte aber das unbefruchtete Ei auch nicht durch NaHO zerstört werden. Dieser Widerspruch findet seine Aufklärung darin, daß die Hydroxylionen die Entwicklung des Eies anregen und es damit in dieselbe Lage versetzen, wie das befruchtete Ei.[1]) Dazu ist es aber nötig, daß erstens die Konzentration der Hydroxylionen relativ hoch ist und daß dieselben 2 Stunden oder länger auf das unbefruchtete Ei einwirken. Durch diese Tatsache wird es klar, warum eine viel höhere Konzentration von Hydroxylionen nötig ist, um die unbefruchteten Eier zu zerstören, als die befruchteten, und

[1]) Pflügers Archiv 118, 577, 1907.

warum die Dauer der Alkaliwirkung so viel größer sein muß, um die unbefruchteten Eier zu vernichten. Das liegt daran, daß das Alkali im Falle der unbefruchteten Eier zwei Wirkungen ausüben muß, indem es nämlich erst die Eier in denselben Zu stand bringen muß, in denen sie infolge der Membranbildung durch das Spermatozoon gebracht werden. Dann erst wirken die Hydroxylionen ähnlich auf das unbefruchtete wie das befruchtete Ei.

V. Wir haben zu Anfang der Arbeit erwähnt, daß die hier mitgeteilten Versuche für die Theorie der Entwicklungserregung des Eies von Bedeutung seien. Ich habe in früheren Arbeiten gezeigt, daß der Vorgang, welcher der Membranbildung zugrunde liegt, die Entwicklung des Eies in Gang setzt.[1]) Es fragt sich, in welcher Weise der Vorgang, welcher der Membranbildung zugrunde liegt, die Entwicklung veranlassen kann. Da alle cytolytischen Mittel die Membranbildung veranlassen, so lag der Gedanke nahe, daß die der Membranbildung zugrunde liegende Cytolyse der Rindenschicht des Eies die Durchgängigkeit des letztern für gewisse Stoffe, die für die Entwicklung nötig sind, erhöhe. Meine Beobachtung, daß NaHO die befruchteten Eier des Seeigels rascher zerstört als die unbefruchteten, schien eine solche Ansicht zu stützen. Die in dieser Abhandlung mitgeteilten Versuche zeigen aber, daß die Erklärung dieser Versuche in anderer Richtung liegt, nämlich im Unterschied der chemischen Reaktionen im befruchteten und unbefruchteten Ei. Der Umstand, daß die Giftwirkung der Hydroxylionen auch im befruchteten Ei durch Cyankalium gehemmt werden kann, spricht für die letzte Möglichkeit. Denn die Durchgängigkeit des Eies wird ja durch Cyankalium nicht vermindert, wohl aber die Geschwindigkeit gewisser chemischer Reaktionen, insbesondere Oxydationen.

Der Zusammenhang zwischen Membranbildung und Entwicklungserregung wird wohl in einer andern Richtung zu suchen sein. Ich habe an die Möglichkeit gedacht, daß infolge der Cytolyse der Rindenschicht des Protoplasmas gewisse Stoffe der Rindenschicht in das Innere des Eies diffundieren, und

---

[1]) J. Loeb, Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies. Berlin 1909. Das Wesen der formativen Reizung. Berlin 1909.

damit die Entwicklung in Gang bringen. Nach dieser Vorstellung enthält das unbefruchtete Ei alle Stoffe, die zum Beginn der Entwicklung nötig sind, aber einer oder mehrere dieser Stoffe liegen (gewissermaßen in einer Kruste) an der Oberfläche des Eies. Erst wenn diese Rindenschicht durch Cytolyse verflüssigt oder sonstwie gebrochen wird, können diese Rindenstoffe in das Innere des Eies diffundieren und hier die Entwicklung anregen. Daß das Spermatozoon diese Cytolyse durch einen spezifischen Stoff, ein Lysin, zustande bringt, der sich auch im Blute und anderen Gewebssäften findet, habe ich an anderer Stelle auseinandergesetzt.[1])

[1]) J. Loeb, Das Wesen der formativen Reizung. Berlin 1909.

Über die Hemmung der Giftwirkung von Hydroxylionen auf das unbefruchtete Seeigelei mittels Sauerstoffmangel.

Von

Jacques Loeb.

(Eingegangen am 16. Mai 1910.)

In einer früheren Arbeit habe ich gezeigt, daß die zerstörende Wirkung der Hydroxylionen auf das befruchtete und unbefruchtete Ei durch Cyankalium gehemmt werden kann, und die Möglichkeit erwähnt, daß diese Cyankaliumwirkung auf eine Hemmung der Oxydationen im Ei zurückzuführen sei. Für diese Annahme waren bereits in meinen früheren Arbeiten Belege vorhanden. So hatte ich schon gezeigt, daß die Giftwirkung einer alkalischen $^3/_8$ m - Calciumchloridlösung durch Sauerstoffmangel stark gehemmt wird.[1]) Es war ferner von mir nachgewiesen, daß die entwicklungserregende und zerstörende Wirkung von hyperalkalischem Seewasser ebenfalls durch Sauerstoffentziehung gehemmt wird.[2]) Da es sich hier um fundamentale Tatsachen des Zellenlebens handelt, so wollte ich nichts dem Zufall überlassen. Es wurden daher neue Versuche vorgenommen, um festzustellen, ob die zerstörende, cytolytische Wirkung einer alkalischen Chlornatriumlösung auf das befruchtete Seeigelei durch Sauerstoffmangel gehemmt oder verzögert wird. Diese Versuche ergaben ein positives, sehr schlagendes Resultat.

Zur Methode der Versuche sei folgendes bemerkt: Um die alkalische Chlornatriumlösung von Luft zu befreien, wurde 3 Stunden lang ein kräftiger Strom von sorgfältig gereinigtem Wasserstoffgas hindurchgetrieben. Der Wasserstoff war aus chemisch reiner Schwefelsäure (Kahlbaum) und chemisch reinem, arsenik-

[1]) Diese Zeitschr. 2, 107, 1906.

[2]) Pflügers Archiv 118, 34, 1907.

freiem Zink mit Platinchlorid als Katalysator hergestellt. Der Wasserstoff wurde durch 2 Flaschen starker Kalilauge und 1 Flasche mit Kaliumpermanganat geleitet. Die Eier eines Seeigels wurden befruchtet und gleich darauf durch 3maliges Waschen in neutraler m/2-Chlornatriumlösung von allen Spuren Seewasser befreit. Dann wurden sie in 5 Flaschen verteilt. 4 dieser Flaschen waren mit dem Wasserstoffentwicklungsapparat verbunden und luftfrei gemacht, die 5. Flasche war in Berührung mit Luft und diente zur Kontrolle. Jede der 5 Flaschen erhielt die gleiche Menge Eier. Mit Hilfe eines Assistenten wurde es so eingerichtet, daß beim Einbringen der Eier in die mit dem Wasserstoffapparat verbundenen Flaschen der Stopfen nur einen Augenblick gehoben wurde. Da gleichzeitig ein sehr kräftiger Wasserstoffstrom durch die Flaschen ging, so gelangte beim Einbringen der Eier nur sehr wenig Luft in die Flaschen. Der Wasserstoffstrom ging ununterbrochen während der ganzen Versuchsdauer durch die Flaschen.

Der folgende Versuch gibt ein Beispiel für den Ausfall der Resultate.

Zu je 50 ccm 0,54 m-NaCl wurden 0,2 ccm $^n/_{10}$-NaHO zugefügt. 4 Flaschen mit diesen Lösungen wurden mit dem Wasserstoffapparat verbunden, und eine blieb zur Kontrolle in Berührung mit Luft. Die 3mal mit NaCl gewaschenen Eier eines Weibchens wurden zu gleichen Mengen auf diese 5 Flaschen verteilt. Die Temperatur war 17°. Nach 2 Stunden 20 Minuten waren die Eier, die in der der Luft ausgesetzten Lösung gewesen waren, fast alle in Schatten verwandelt, und die wenigen, die noch intakt waren, gingen zugrunde, nachdem sie in Seewasser übertragen waren. Um dieselbe Zeit wurde eine Flasche mit Eiern vom Wasserstoffapparat getrennt und die Eier sofort in Seewasser übertragen. Nur etwa 1% dieser Eier war in Schatten verwandelt, über 90% entwickelten sich zu normalen Larven, die übrigen entwickelten sich abnorm oder gingen zugrunde. Die 2. Flasche wurde nach 4 Stunden vom Wasserstoffapparat getrennt, und die Eier wurden wieder sofort in normales Seewasser übertragen. Auch diesmal entwickelten sich noch etwa 90% der Eier, die Entwicklung war aber nicht mehr bei allen normal. Das war aber wesentlich oder lediglich Folge des Sauerstoffmangels, da ich schon früher gezeigt habe,

daß befruchtete Eier auch in Seewasser geschädigt werden, wenn sie nur 4 Stunden ohne Sauerstoff bleiben.[1])

Nach weiteren 2 Stunden, also $6^1/_2$ Stunden nach Beginn des Versuches, wurde die 3. Flasche vom Apparat getrennt und die Eier derselben in normales Seewasser übertragen. 75% der Eier entwickelten sich zu Larven.

Die letzte Flasche wurde am nächsten Morgen vom Wasserstoffapparat entfernt, 22 Stunden nach Beginn des Versuches. Die Eier waren intakt, als sie an die Luft gebracht wurden, sie waren aber nicht mehr imstande, sich zu entwickeln. Das war zum Teil, aber nicht völlig, Wirkung des Sauerstoffmangels.

Dieser Versuch beweist also, daß bei Sauerstoffmangel die alkalische Lösung weniger als ein Drittel der Giftigkeit entfaltet, die sich zeigt, wenn dieselbe Lösung der Luft ausgesetzt ist. Dieser Versuch wurde mit ähnlichen Resultaten 2 mal wiederholt.

Diese und die früheren Versuche beweisen, daß die alkalische Chlornatriumlösung deshalb das befruchtete Ei rascher zerstört als das unbefruchtete, weil in dem befruchteten Ei die Oxydationsprozesse rascher verlaufen als im unbefruchteten; sie unterstützen aber nicht die Ansicht, daß die Befruchtung oder die Hervorrufung der Membranbildung die Durchlässigkeit des Eies für Hydroxylionen erhöht.

Es wird vielleicht den Pathologen überraschen, daß die Alkalicytolyse durch Sauerstoffmangel oder Cyankalium gehemmt werden kann. Ich beabsichtige, durch weitere Versuche festzustellen, ob das allgemein zutrifft oder ob es nur eine Eigentümlichkeit des Eies ist. Über den Zusammenhang zwischen Oxydationsvorgängen und Alkalicytolyse habe ich schon früher eine Vermutung ausgesprochen, die ich hier zitieren will: „Diese Tatsachen unterstützen die Ansicht, daß die Giftigkeit einer Salzlösung mit zunehmender Konzentration der Hydroxylionen deshalb zunimmt, weil die OH-Ionen die Geschwindigkeit gewisser Reaktionen im Ei, besonders der Oxydationen, erhöhen. Handelt es sich um eine reine Kochsalzlösung, so entstehen zu viele Natriumverbindungen gewisser Stoffe, und das Ei geht infolgedessen an schwarzer Cytolyse zugrunde. Diese von der

[1]) Diese Zeitschr. 1, 201, 1906.

Oxydationsbeschleunigung herrührende Komponente der Giftigkeit einer alkalischen Salzlösung wird natürlich durch Cyankalium oder Sauerstoffmangel gehemmt."[1]) Diesem Resumé habe ich heute nur folgendes hinzuzufügen. Meine neueren Versuche haben gezeigt, daß nicht nur die sogenannte schwarze Cytolyse, sondern auch die Schattenbildung, die in Gegenwart von Sauerstoff in einer alkalischen Chlornatriumlösung hervorgerufen wird, durch Sauerstoffmangel oder Zusatz von Cyankalium gehemmt wird. Zweitens möchte ich an eine frühere Arbeit erinnern, in der ich gezeigt habe, daß die Cytolyse, die in einer alkalischen Lösung von NaCl oder KCl auftritt, durch Zusatz irgend eines Salzes mit zweiwertigem Metall, insbesondere Ca, gehemmt wird.[2]) Wenn wir von der Vermutung ausgehen, daß ein Oxydationsprodukt die Cytolyse bedingt, so kann man daran denken, daß dieses Oxydationsprodukt mit Na und K (und vielleicht vielen einwertigen Kationen) lösliche Körper, mit zweiwertigen Kationen aber unlösliche resp. schwer lösliche Körper bildet. Als Beispiel solcher Produkte können die Seifen dienen.

[1]) Diese Zeitschr. 2, 108, 1906.
[2]) Diese Zeitschr. 5, 351, 1907.

Untersuchungen über die Guanylsäure.

Von

Ivar Bang.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 8. Mai 1910.)

Mit 1 Figur im Text.

Vor etwa 10 Jahren habe ich[1]) eine Nucleinsäure der Pankreasdrüse beschrieben, die entgegen den damals bekannten nur eine Purinbase, nämlich Guanin, enthielt. Demgemäß wurde sie Guanylsäure benannt. Von anderen Spaltungsprodukten konnte ich außer Phosphorsäure eine Pentose und kleine Mengen Ammoniak nachweisen. Im ganzen wurden ca. 80% der Säure an diesen Spaltungsprodukten wiedergefunden. In einer folgenden Mitteilung[2]) wurde gezeigt, daß außerdem noch Glycerin vorkommt. Schließlich habe ich[3]) mit Raaschou zusammen gefunden, daß die erwähnte Nucleinsäure ein Umwandlungsprodukt einer anderen etwas mehr zucker- (und glycerin-) haltigen Nucleinsäure darstellt, die mit α-Guanylsäure bezeichnet wurde. Die alte Säure sollte in Übereinstimmung hiermit dem Namen β-Guanylsäure bekommen.

Nach mehreren Jahren erschien eine Nachprüfung von v. Fürth und Jerusalem[4]), die daran gipfelte, daß eine Nucleinsäure mit der von mir angegebenen Zusammensetzung

---

[1]) Bang, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 133, 1898.

[2]) Bang, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 411, 1901.

[3]) Bang und Raaschou, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 175, 1903.

[4]) v. Fürth und Jerusalem, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 174, 1907.

nicht existiere. Die Pankreasnucleinsäure enthalte keine Pentose und kein Glycerin, dagegen außer Guanin noch Adenin und Pyrimidinbasen.

Von mir[1]) auf einige prinzipielle Versuchsfehler aufmerksam gemacht, änderten v. Fürth und Jerusalem[2]) ihre Auffassung derartig, daß sie die Existenz der β-Guanylsäure zugaben, während sie die α-Säure mit der Thymusnucleinsäure identifizierten. Hierzu wirkte eine Publikation von Steudel[3]) mit, der meine Angaben über die β-Guanylsäure mit Ausnahme des Glycerins bestätigen konnte, während anderseits Steudel die α-Säure als mit der Thymusnucleinsäure identisch annahm.

Nun wäre es aber recht sonderbar, daß ich diese α-Säure mit einer Thymusnucleinsäure verwechselt haben sollte, da die letztere keine Pentose und übrigens eine ganz andere Zusammensetzung als die Guanylsäure besitzt, da ich doch selber die Guanylsäure gefunden und untersucht habe und übrigens selbst ausdrücklich auf die Existenz einer anderen von der Guanylsäure verschiedenen Thymusnucleinsäure in der Pankreasdrüse aufmerksam gemacht habe. Die Argumente v. Fürths gegen ihre Existenz sind auch nichts weniger als überzeugend, und seine Ablehnung der α-Säure, nicht aber der β-Säure stellt wohl eigentlich nur einen vorsichtigen Rückzug dar.

Indessen waren diese verschiedenen Publikationen für mich eine Veranlassung, die Untersuchungen über die Guanylsäure wieder aufzunehmen. In den letzten 3 Jahren habe ich mich gelegentlich damit beschäftigt, und obwohl meine Versuche im großen und ganzen hauptsächlich meine früheren Untersuchungen bestätigt haben, ist doch etwas Neues gefunden, das einer Publikation wert ist. Auch habe ich einige Berichtigungen zu machen.

Bei diesen Untersuchungen bin ich erst zur Darstellung der Nucleinsäure auf das β-Proteid zurückgegangen. Hierbei habe ich ein neues Verfahren zur Proteiddarstellung ausfindig gemacht, das eine wesentlich bessere Ausbeute als die ursprüng-

[1]) Bang, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 76, 1908.

[2]) v. Fürth und Jerusalem, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 146, 1908.

[3]) Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 541, 1907.

liche Methode Hammarstens liefert. Schlägt man nämlich nach Hammarsten das Pankreasdekokt mit Essigsäure nieder, so bekommt man in dem Niederschlag nur einen relativ geringen Teil der pentosegebenden Substanz. Aus dem Filtrate läßt sich durch Salzsäure etwas mehr fällen. Der Niederschlag löst sich aber leicht in einem geringen Säureüberschuß. Viel vorteilhafter gestaltet sich aber die Verwendung von Oxalsäure, die eine ganz bedeutend größere Proteidquantität liefert. Und im Filtrate ist die Pentosereaktion nur schwach. Von der Oxalsäure muß man recht beträchtliche Quantitäten verwenden; anderseits wirkt ein Überschuß von Oxalsäure schädlich, indem das Proteid hierdurch sich aufzulösen anfängt. Weiter ist die Kochzeit des Pankreasbreies von Bedeutung. Hammarsten kocht nur mit Wasser auf und filtriert gleich. Besser ist es, das Kochen 6 bis 10 Minuten fortzusetzen und den Rückstand nochmals 3 bis 4 Minuten auszukochen. Aus den vereinigten Filtraten schlägt man dann das Proteid mit Oxalsäure nieder.

Für die Proteiddarstellung kann ich demzufolge folgendes Verfahren empfehlen: 15 Stück — zirka 5 kg — Ochsenpankreas werden in der Fleischhackmaschine zerkleinert, mit 4 l Wasser angerührt und unter Umrühren bis zum Kochen erhitzt. Man läßt die Mischung 6 bis 10 Minuten ruhig kochen und trennt schließlich die Flüssigkeit von dem ungelösten durch Kolieren. Der Rückstand wird mit 3 l Wasser versetzt, aufgekocht, 3 Minuten im Kochen gehalten und koliert. Das dritte und vierte Dekokt geben auch noch nicht unbeträchtliche Proteidmengen. Da aber das Ausgangsmaterial billig ist, und die Filtration ziemliche Zeit dauert, braucht man dieselben nicht zu berücksichtigen. Die vereinigten Kolaturen werden — am besten nach dem Erkalten — filtriert. Die vereinigten Filtrate werden mit etwa 4 g Oxalsäure pro Stück Pankreas niedergeschlagen, indem die Oxalsäure für sich zuerst in Wasser gelöst wird. Nach 24 Stunden hat sich der sehr reichliche Niederschlag gut und kompakt abgesetzt. Man entfernt die überstehende Lösung mit dem Heber und schwemmt den Niederschlag in ca. 2 l Wasser auf. Nach einigen Stunden hat sich die Fällung abgesetzt, und das Wasser kann entfernt werden. Sie wird noch einmal gereinigt und ist nun zur Guanylsäuredarstellung fertig.

Der Proteidniederschlag ist weiß, die überstehende Lösung sowie das Waschwasser gelb gefärbt. Ausbeute sehr gut: pro Kilogramm Pankreas 20 bis 25 g Proteid. Das Proteid ist aber nicht ganz rein, indem nach Auflösung in verdünnter Lauge ein weißer Rückstand — wesentlich wohl aus Calciumoxalat bestehend — zurückbleibt. Abgesehen davon enthält mein Proteid nur 15,09% N und 3,40% P, während Hammarsten für sein Proteid, das durch Essigsäure niedergeschlagen war, 17,39% N und 4,48% P gefunden hat. Da indessen das Proteid hier nur das Rohmaterial für die Guanylsäuredarstellung bildet, ist mein Verfahren in Betracht der guten Ausbeute vorzuziehen.

Zur Darstellung der Guanylsäure aus dem Proteid habe ich meine ursprüngliche Methode: Kochen mit Alkali, Entfernung des Alkalialbuminats durch Neutralisation und Reinigung der β-Säure durch „Umkrystallisation" aus kochendem Wasser verlassen. Unter anderen deshalb, weil sie mit großen Verlusten verknüpft ist.

Meine neue Methode ist auf der folgenden Tatsache basiert. Setzt man zu einer β-Proteidlösung $(NH_4)_2SO_4$ bis $^1/_2$ oder $^2/_3$ Sättigung hinzu, so schlägt sich das meiste Eiweiß nieder, und die Lösung enthält die Guanylsäure, die jetzt bequem gereinigt werden kann.

Da man also in dieser Weise ohne Verwendung von Alkali die Guanylsäure vom Eiweiß trennen kann, ist es überhaupt fraglich, ob tatsächlich auch im β-Proteid ein chemisches Individuum vorliegt oder nicht. Die Tatsachen sind zweideutig und sprechen sowohl pro wie kontra:

Für die Existenz sprechen: 1. Bei der Analyse verschiedener Präparate fanden Hammarsten u. a. seine Zusammensetzung konstant. 2. Das nucleinsaure Histon aus Thymus wird durch Sättigung mit Kochsalz nach des Verfassers Untersuchungen gespalten.

Dagegen ist folgendes zu bemerken: 1. Das nucleinsaure Histon läßt sich durch $(NH_4)_2SO_4$ mit unveränderten Eigenschaften aussalzen. 2. Die α-Guanylsäure, die hier allein in Betracht kommt, besitzt eiweißfällende Eigenschaften. 3. Nach Halb- und Ganzsättigung einer β-Proteidlösung mit $(NH_4)_2SO_4$ bleibt noch etwas Eiweiß in Lösung. Das β-Proteid mußte

also jedenfalls mehrere Eiweißkomponenten enthalten, was in Betracht seines hohen P-Gehaltes kaum wahrscheinlich erscheint. 4. Das durch $(NH_4)_2SO_4$ ausgesalzte Eiweiß verhält sich wie eine primäre Albumose. Da wir nun Grund haben anzunehmen, daß die Autodigestion des Pankreas gleich nach dem Tode beginnt, wäre es sehr plausibel, daß durch Kochen unkoagulables Eiweiß vorkommen könnte. Nach Auftreten der Guanylsäure durch Spaltung des α-Proteids beim Kochen könnte diese Nucleinsäure mit dem in Lösung befindlichen Eiweiß bei saurer Reaktion den Niederschlag geben, der als β-Proteid bezeichnet worden ist. Wäre die Guanylsäure immer in Überschuß vorhanden, so müßte der Niederschlag einen konstanten P-Gehalt zeigen. 5. Versetzt man ein Dekokt aus Pankreas mit nativem Eiweiß, so liefert Essigsäure einen größeren Niederschlag als sonst. 6. Das α-Proteid wird nicht durch $(NH_4)_2SO_4$ gespalten. 7. Wie Hammarsten bemerkt, ist es aber schwer, das α-Proteid zu reinigen. Von einem solchen Präparat (NaCl-Extrakt mit A niedergeschlagen und im Minimum Alkali gelöst) ausgehend, erhält man beim Kochen das β-Proteid; koaguliert man aber das Extrakt mit Alkohol, so kann man eine Verbindung durch Wasser herauslösen, die beim Kochen koaguliert. Aus dem Filtrate schlägt HCl die reine Guanylsäure nieder. Diese Beobachtungen fordern jedoch eingehendere Untersuchungen, bevor man darüber entscheiden kann.

Bei einer solchen Sachlage kann man also kein bestimmtes Urteil über die Existenz oder Nicht-Existenz des β-Proteids abgeben. Doch finde ich, daß die Tatsachen eher gegen eine Existenz sprechen. In solchem Falle wäre das α-Proteid dem nucleinsauren Histon vergleichbar, indem beide aus nur einer Eiweißkomponente beständen. Unter allen Umständen sind diese Beobachtungen geeignet, unsere Auffassung über die Konstitution des Pankreasproteids zu ändern.

Zur Darstellung der Guanylsäure wird die gereinigte Proteidfällung von 15 Pankreasdrüsen in möglichst wenig Kalilauge gelöst. Gesamtvolum ca. 500 ccm. Man setzt 260 g Ammoniumsulfat in Substanz hinzu, erwärmt zweckmäßig bis zur Lösung des Salzes und filtriert gleich. Die Filtration geht rasch von statten. Der Rückstand wird mit ca. 100 ccm Wasser erwärmt und nachher mit 200 ccm gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung

versetzt, erwärmt und filtriert. Das Filtrat wird mit dem ersten vereinigt. Der Rückstand gibt kaum Pentosereaktion und wird vernachlässigt. Man verdünnt jetzt das Filtrat mit 3 bis 4 l Wasser und schlägt die Guanylsäure mit Kupfersulfat (noch besser, aber teurer, ist Kupferacetat) nieder, indem man mit NH_3 neutralisiert bzw. äußerst schwach alkalisch macht. Der Niederschlag wird durch Dekantation-Filtration gereinigt. Da der Niederschlag nach Entfernung des Kupferüberschusses sich teilweise auflöst, muß man immer neues Kupfersulfat + Alkali oder NH_3 hinzufügen. Bei Verwendung von Kupferacetat ist der Alkalizusatz überflüssig. Schließlich wird die blaßgrüne Fällung in ca. 100 ccm Wasser aufgeschwemmt (Gesamtvolum zirka 250 ccm) und unter Erwärmen mit H_2S während 1 Stunde behandelt. Das Kupfersulfid setzt sich gut ab. Ist aber noch guanylsaures Kupfer vorhanden, so löst sich das CuS zu einer kolloidalen Lösung. In solchem Falle setzt man das Durchleiten von H_2S fort. Nach der Filtration hat man eine schwach gelb gefärbte Lösung, die kaum Eiweißreaktionen gibt. Dagegen hält das Kupfersulfid etwas Eiweiß zurück. Man entfernt den H_2S-Überschuß und setzt tropfenweise 25% Salzsäure bis zur maximalen Fällung hinzu. Hierzu ist eine ziemlich große Quantität Säure erforderlich. Außer der freien ausgefällten Guanylsäure bleibt eine nicht zu geringe Menge saures guanylsaures Alkali in Lösung. Man setzt deswegen ohne Filtration 2 Volumina Alkohol (96%) hinzu und filtriert nach einigen Stunden. Der Rückstand wird mit ca. 100 ccm Wasser digeriert. Außer der ungelöst gebliebenen freien Guanylsäure geht das guanylsaure Alkalisalz in Lösung und wird durch Salzsäure als freie Guanylsäure gefällt. Man wäscht mit Wasser aus. Nach Alkohol-Ätherbehandlung bekommt man die Guanylsäure als schneeweißes Pulver analysenrein. Ausbeute ca. 4 bis 5 g.

Diese Säure ist die α-Guanylsäure. Als Alkalisalz ist sie in Wasser löslich und wird hieraus nicht durch Essigsäure niedergeschlagen. Da sie weiter zur Fällung ziemlich viel Salzsäure erfordert, ist es zu entschuldigen, daß ich und Raaschou die Fällbarkeit durch Salzsäure früher übersehen haben. Mit 1% HCl bekommt man nur auf Zusatz größerer Säuremengen eine Fällung.

Diese α-Guanylsäure zeigt mit der Thymusnucleinsäure ziemlich übereinstimmende Eigenschaften: Beide werden von Essigsäure nicht gefällt, sondern erst durch Salzsäure als ein kompakter Niederschlag. Sie sind also in Wasser unlöslich oder jedenfalls sehr schwer löslich. Selbst eine sehr verdünnte Lösung von guanylsaurem Alkali gibt mit HCl Fällung. Beide fällen Eiweiß. Eine Guanylsäurelösung diffundiert nicht durch Pergamentpapier. Die Guanylsäure besitzt also ebenso wie die Thymusnucleinsäure ein hohes Molekulargewicht. Beide sind mehrbasische Säuren. Beide sind etwas hydroskopisch. Beim Trocknen bei 100° werden beide zersetzt.

Es ist weiter von Interesse, welche Zusammensetzung diese α-Guanylsäure besitzt, und welche ihre Spaltungsprodukte sind.

Ein Präparat α-Säure wurde bei 37° über Chlorcalcium getrocknet, was ca. 3 Wochen dauert. 0,2621 g ergaben 0,3252 g CO_2 und 0,1032 g $H_2O = 33,84\%$ C und $4,41\%$ H.[1]) — 0,2226 g ergaben nach Kjeldahl 39,48 mg $N = 17,74\%$ N und 0,3753 g, nach Naumann 30,25 mg $P = 8,06\%$ P. 0,4066 g Substanz lieferten 0,0161 g Asche $= 0,40\%$, davon viel P_2O_5.

Vergleichen wir die Ergebnisse dieser Analysen mit den Befunden bei der Analyse der β-Guanylsäure in meiner ersten Abhandlung, so wird ersichtlich, daß die α-Guanylsäure genau dieselbe Zusammensetzung wie die β-Säure zeigt.

	Für α-Guanylsäure gefunden	Für β-Guanylsäure gefunden
C	33,84%	34,18%
H	4,41 „	4,43 „
N	17,74 „	18,21 „
P	8,06 „	7,68 „

Die Differenzen sind ganz unwesentlich.

Früher haben aber ich und Raaschou für die α-Guanylsäure nur 15,28% N und 6,59% P gefunden. Ich glaube diese Differenzen durch folgende Beobachtung zum Teil erklären zu können:

Setzt man zu einer noch etwas eiweißhaltigen α-Guanylsäurelösung Kupfersulfat + Alkali, so kann man eine rein blaue Färbung ohne Andeutung der Biuretreaktion kriegen. Erst nach Aufkochen und Filtration kommt die Reaktion zum Vorschein. Vielleicht haben wir uns damals durch diese Fehlerquelle getäuscht, die man also berücksichtigen muß. Weiter haben wir sicher nicht die freie Säure selbst, sondern das Salz untersucht, aber als freie Säure berechnet.

[1]) Die C- und H-Analysen wurden freundlichst von Dozent Holmberg ausgeführt.

Die α-Guanylsäure ist, wie ich früher für die β-Säure gefunden habe, eine 5-basische Säure. 0,9952 g abgewogen und in Überschuß von $^n/_2$-KOH gelöst. Zurücktitration mit Phenolphthalein als Indicator durch $^n/_2$-H_2SO_4. Gefunden 0,1248 g K = 2,5%. Berechnet 11,24% K.

Indem die Besprechung der Spaltungsprodukte dem folgenden Abschnitte vorbehalten wird, gehe ich jetzt zu der Besprechung der β-Guanylsäure über.

Man kocht eine Lösung der α-Guanylsäure mit 2 bis 3% KOH $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbad, versetzt die Lösung mit Essigsäure bis zu saurer Reaktion in der Wärme und filtriert warm; das ganze Filtrat gelatiniert beim Abkühlen, wenn die Lösung genügend stark konzentriert ist. Wir finden also auch hier eine Übereinstimmung zwischen der Guanylsäure und der Thymusnucleinsäure, die bekanntlich auch nach Kochen mit Alkali bei Gegenwart von Alkaliacetat gelatiniert.

Läßt man das neutralisierte Filtrat abkühlen und am besten einige Zeit stehen, so bekommt man, wenn die Lösung nicht zu konzentriert ist, durch Essigsäure einen Niederschlag, der beim Erwärmen sich auflöst, um beim Erkalten wieder zu erscheinen. Diese β-Guanylsäure kann auch durch Salzsäure niedergeschlagen werden, der Niederschlag löst sich aber viel leichter in Überschuß von Salzsäure als die α-Guanylsäure. Sie besitzt also die Eigenschaften, die ich früher als für die β-Guanylsäure als charkteristisch beschrieben habe.[1]) Dies trifft auch für die Zusammensetzung zu.

Das Analysepräparat wurde aus einer α-Guanylsäure (die allerdings noch etwas $(NH_4)_2SO_4$ enthielt) dargestellt. Nach Kochen mit KOH und Ansäuern mit Essigsäure wurde mit Alkohol niedergeschlagen, wodurch allerdings das guanylsaure Alkali ausgeschieden wurde. Infolgedessen war der Aschengehalt hoch.

Nach dem Trocken bei 100° lieferten 0,1997 g Substanz 27,86 mg N = 13,58%. 0,3873 g = 23,08 mg P = 5,96%. 0,3426 g = 0,3248 g CO_2 und 0,0970 g H_2O = 25,86% C und 3,17% H.[2]) 0,8525 g Sub-

[1]) Kleinere Unterschiede sind doch nachweisbar. Diese Säure fordert mehr Essigsäure zur Fällung und schlägt sich mehr gelatinös als die alte nieder. Bisweilen habe ich jedoch keinen Unterschied entdecken können. Die Alkalikonzentration, Kochzeit u. dgl. können wohl die kleinen Differenzen erklären.

[2]) Die C- und H-Analysen sind freundlichst von Dozent Holmberg ausgeführt.

stanz ergab 0,2921 g Asche, davon 36,56 mg P = 93,1 mg P_2O_5 = 0,1990 g Asche = 23,3%. Die Asche enthielt reichlich Kalium und gab zudem Reaktion auf Schwefelsäure. Die Verarbeitung von 1,1642 g Substanz nach der Veraschung zur K-Bestimmung nach der Perchloratmethode, ist teilweise mißlungen. Bei der Berührung mit Pt-Mohr in dem Naumann-Tiegel verbrannte das Kaliumperchlorat explosiv; 170 mg K, als KCl berechnet, gefunden (der Tiegel wurde schließlich geglüht) = 15% K.

Auf aschefreie Substanz umgerechnet sind gefunden: 34,22% C, 4,2% H, 18,0% N und 7,9% P. Die Werte stimmen gut mit den von mir früher für die β-Guanylsäure angegebenen.

Aus den analytischen Daten geht also hervor, daß die α- und β-Guanylsäuren dieselbe Zusammensetzung besitzen. Wie später gezeigt werden soll, ist auch ihre rationelle Zusammensetzung dieselbe. Sie verhalten sich genau wie die Thymusnucleinsäuren. Man ist also berechtigt, auch die α-Guanylsäure aufzustellen, dagegen sind die früheren Angaben von mir und Raaschou betreffs der verschiedenen Zusammensetzung beider unrichtig.

Die Spaltungsprodukte der Guanylsäuren.

1. Die stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte. Von solchen sind von mir in der β-Guanylsäure nachgewiesen: Guanin und Ammoniak. Diese Angaben sind von Steudel bestätigt worden. Für die Guanylsäure haben ich und Raaschou Guanin nachgewiesen. v. Fürth und Jerusalem glauben auch Adenin u. a. gefunden zu haben. Da sie aber eine Methodik benutzen, nach der man hier absolut falsche Resultate erhalten muß, sind ihre Bestimmungen ganz wertlos.

Für mich waren jetzt zwei Fragen von Interesse. Erstens inwieweit das vorliegende Guanin mit dem gewöhnlichen (2-Amino-6-oxypurin), oder mit dem Isoguanin (6-Amino-2-oxypurin) identisch ist. Eine andere Frage war die Abstammung des gebildeten Ammoniaks, inwieweit es, wie in meiner ersten Mitteilung erwähnt, sekundär durch Hydrolyse des Guanins entsteht oder ein primäres Spaltungsprodukt der Guanylsäure darstellt.

Eine Portion Guanin aus der α-Guanylsäure wurde mehrmals als Guanin-Silbernitratverbindung umkrystallisiert und schließlich in das Hydrochlorat übergeführt.

Das lufttrockene Präparat gab bei 100° 15,32% H_2O ab gegen berechnet 16,11% (0,5341 g Substanz 0,0818 g H_2O).

0,1223 g Substanz ergeben 45,3 mgr N = 37,20%. Für $C_5H_5N_5O$. HCl berechnet 37,33%. Die Pt-Verbindung zeigte 27,17% Pt (0,0530 g Substanz = 0,0144 g Pt). Berechnet für $C_5H_5N_5O$. HCl, $PtCl_4$ = 27,4% Pt. Schmelzpunkt des Pikrates: Bei 262° bis 265° beginnende Mißfärbung. Bei 275° bis 280° Verkohlung. Ein anderes Präparat wurde als Sulfat analysiert. Das im Exsiccator getrocknete Sulfat enthielt 1. 31,35% N und 22,28% H_2SO_4; 2. 31,96% N und 22,11% H_2SO_4. (1. 0,1610 g Substanz = 50,47 mg N = 31,35%, 0,3621 g Substanz = 0,1940 g $BaSO_4$ = 22,28% H_2SO_4. 2. 0,1370 g Substanz = 43,8 mg N = 31,96%, 0,3198 g Substanz = 0,1697 g $BaSO_4$ = 22,11%.) Für $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4 + 2\,H_2O$ berechnet 32,11% N und 22,46% H_2SO_4. Das Wägegläschen wurde 2 Stunden bei 120° getrocknet, 0,1270 g Substanz = 42,7 mg N = 33,62% (berechnet für $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4$ = 35,0%; für $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4 + H_2O$ = 33,49%). Nach 7 Stunden bei 120° lieferten 0,3181 g Substanz 0,1810 g $BaSO_4$ = 23,9% H_2SO_4. Berechnet für $(C_5H_5N_5O)_2H_2SO_4$ = 24,0% H_2SO_4.

Hieraus kann gefolgert werden, daß das Guanin mit dem gewöhnlichen identisch ist.

Ich habe die Guaninanalysen so ausführlich ausgeführt und wiedergegeben, weil das aus der Guanylsäure direkt ohne Reinigung untersuchte Guanin sich recht eigentümlich verhält. Z. B. ist sein Stickstoffgehalt immer geringer als berechnet. In meiner ersten Mitteilung habe ich 45,82% N gefunden gegen berechnete 46,35%. Steudel fand 45,45% N. Bei meinen jetzigen Untersuchungen fand ich 45,2%, 45,0%, 44,5% bis sogar 42,84% N.

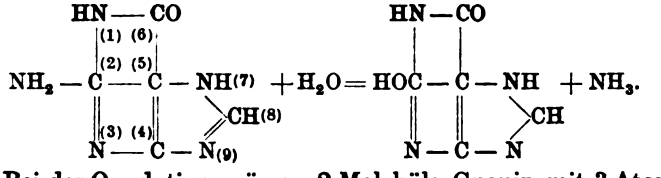
Weiter bemerkte ich beim Auswaschen, daß der NH_3-Niederschlag der hydrolysierten Guanylsäure schließlich, wenn alles Ammoniak ausgewaschen war, trübe durch das Filter zu gehen anfing. Setzte ich aber eine Spur NH_3 zu, so bekam ich wieder ein wasserklares Filtrat. Hieraus kam ich auf den Verdacht, daß der Niederschlag nicht einheitlicher Natur war. Ich versuchte dann die Trennung der eventuell vorkommenden Bestandteile des Niederschlages durch kochendes Wasser auszuführen, da bekanntlich Guanin auch in kochendem Wasser äußerst schwer löslich ist. Tatsächlich ging auch beim Kochen eine allerdings nicht beträchtliche Fraktion in Lösung, die beim Abkühlen sich wieder größtenteils ausschied. Hierzu waren große Wassermengen notwendig — ca. 1 l H_2O auf 0,5 bis 1,0 g Rohguanin. Der Rückstand wurde mehrmals ausgekocht.

Das oben erwähnte Präparat mit 42,8% N in dieser Weise behandelt lieferte einen Rückstand mit 44,18% bzw. 44,01% N. Der umkrystallisierte Teil zeigte 39,92% N bzw. 39,26% N. Die in Lösung gegangene Substanz enthielt also weniger N als der Rückstand. Nach dem N-Gehalt konnte man vermuten, daß die löslichere Substanz wahrscheinlich Xanthin entsprechen mußte. Xanthin enthält 36,84% N gegen 46,43% des Guanins. Nach Almén löst sich 1 Teil Xanthin bei 16° in 14151 Teilen Wasser, bei 100° dagegen in 1300 bis 1500 Teilen. Da nun das Guanin nicht ganz in heißem Wasser unlöslich ist, kann man kaum erwarten, allein durch Umkrystallisieren zu reinen Präparaten zu kommen. Die Xanthinfraktion gab auch eine positive Murexidreaktion. Dagegen läßt sich das Xanthin besser durch das Silberverfahren von dem Guanin trennen, indem das Xanthinsilbernitrat in Salpetersäure leichter löslich ist als die entsprechende Guaninverbindung. Nach Erkalten der heißen Lösungen von beiden Doppelsalzen bleibt das Xanthinsilber in Lösung, während das Guaninsilbernitrat sich ausscheidet. Oben ist erwiesen, daß man nach diesem Verfahren aus dem Rohguanin ein reines Guanin kriegen kann. Zerlegt man nun die in Lösung gebliebene Xanthinsilberverbindung, so bekommt man auch aus der Guanylsäure reines Xanthin. Das ursprüngliche Präparat enthielt 45,2% N. Es wurde über die Silberverbindung ein prachtvoll krystallisiertes Xanthinnitrat, das in Salpetersäure schwer löslich war, dargestellt. Die HCl-Verbindung war ebenfalls recht schwer löslich. Dagegen wurde das Xanthinnitrat nicht von Wasser zerlegt — entgegen der entsprechenden Guaninverbindung. Eine N-Bestimmung ist mißlungen. Das Xanthin war in Ammoniak leicht löslich. Dessenungeachtet wird es also mit dem Guanin zusammen durch überschüssiges NH_3 ausgeschieden. Ein Versuch, durch größeren NH_3-Zusatz das Xanthin von dem Guanin zu trennen, scheiterte.

Xanthin kommt also neben Guanin — obwohl in weit geringerer Menge — unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Guanylsäure vor. Es fragt sich dann, inwieweit es auch präformiert in der Nucleinsäure existiert oder ob es erst durch die Hydrolyse gebildet wird. Das letztere ist nun entschieden das wahrscheinlichste. Abgesehen von der recht kleinen Xanthinmenge kann man Guanin durch Kochen mit 2% HCl oder

5% H_2SO_4 zum Teil in Xanthin überführen. Ein ausgekochtes Rohguaninpräparat wurde hydrolysiert. Nach Neutralisation ließ sich wieder Xanthin durch Kochen gewinnen. Ein anderes Präparat mit 44,5% N zeigte nach Hydrolyse 42,54% N. Reines Guaninchlorid (das analysierte Präparat Nr. 1) zeigte nach der Hydrolyse 45,25% bzw. 45,0% N als Guanin analysiert.

Schon in meiner ersten Mitteilung habe ich das Vorkommen von NH_3 unter den Spaltungsprodukten der Guanylsäure gefunden und ich habe damals hervorgehoben, daß das NH_3 sekundär aus dem Guanin gebildet wurde. Ich konnte auch bei reinem Guanin nach der Hydrolyse ein Auftreten von NH_3 beobachten. Hiermit in Übereinstimmung steht der Nachweis des Xanthins: $C_5H_5N_5O + H_2O = C_5H_4N_4O_2 + NH_3$. Hiernach sollte also das Guanin hydrolytisch in Xanthin und Ammoniak zerlegt werden. Dies braucht gar nicht mit Strecker-Fischers Angaben, daß Guanin durch Oxydation in Xanthin übergeht, in Widerspruch zu stehen. Durch die Hydrolyse ist der Vorgang folgendermaßen erklärlich.



Bei der Oxydation müssen 2 Moleküle Guanin mit 3 Atomen O reagieren oder: $2(NH_2-\overset{|}{\underset{\|}{C}}-) + O_3 = 2\,\overset{|}{\underset{\|}{C}}OH + N_2 + H_2O$. Nimmt man eine 2-Iminogruppe an, so bekommt man durch Hydrolyse $-\overset{|}{\underset{\|}{C}}-NH + H_2O = \overset{|}{\underset{\|}{C}}O + NH_3$. Durch Oxydation entsteht aus $2\,CNH + O_3 = 2\,CO + N_2 + H_2O$. Bei E. Fischers Methode[1]), wo man in schwefelsaurer Lösung mit Natriumnitrat oxydiert, dürften beide Vorgänge stattfinden. Das gebildete NH_3 wird dann weiter vom Nitrit umgesetzt. Ich habe nach dieser Methode mir Xanthin aus Guanin dargestellt und mit dem hydrolytisch dargestellten verglichen. Die Übereinstimmung war vollkommen.

Die Tatsache, daß man durch Hydrolyse zu Xanthin kommen kann, hat besonders Interesse, wenn man an die

[1]) E. Fischer, Ann. d. Chem. 215, 253, 1882.

Nucleasen und speziell an die Guanase erinnert. Man hat hier bekanntlich angenommen, daß diese Nucleasen Oxydationsenzyme sind. Jetzt muß man zu der Frage Stellung nehmen, ob wir es hier tatsächlich nicht mit hydrolytisch wirkenden Enzymen zu tun haben. Wäre dies der Fall, so besteht ein prinzipieller Unterschied zwischen den Nucleasen und dem harnsäurebildenden Enzym, welch letzteres tatsächlich ein Oxydationsferment sein muß.

Schließlich bleibt noch zu untersuchen, wieviel Guanin (nebst Xanthin) aus der Guanylsäure sich darstellen läßt.

Von dem oben erwähnten Präparat der α-Säure wurden 0,4088 g 3 Stunden mit 100 ccm 5%iger H_2SO_4 gekocht. Nachdem 10 ccm für die Zuckertitration abgenommen worden waren, wurde das Guanin mit NH_3 niedergeschlagen. Gefunden 0,1088 g. Das Filtrat lieferte 0,099 g Silberfällung = 0,039 g Guanin (alles auf 100 ccm Gesamtvolum umgerechnet). Gesamtguanin = 0,1478 g = 36,15%. Es sei bemerkt, daß das Filtrat schließlich trübe durchging, weshalb die Silberfällung so groß ist.

Von der β-Guanylsäure lieferten nach der Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure 2,0143 g Substanz direkt durch NH_3 0,5928 g Guanin + 0.023 g der Silberfällung = 0,6158 g = 30,5%. Auf aschefreie Substanz umgerechnet 39,5%. Ich habe früher 35 bis 36% Guanin gefunden. Steudel 34,72%.

2. Die stickstofffreien Spaltungsprodukte. Von diesen kommt — außer Phosphorsäure — die reduzierende Substanz in Betracht. v. Fürth und Jerusalem haben die Vermutung ausgesprochen, daß diese eine Beimischnng von Glykogen darstellt. Dies ist schon aus dem Grunde unmöglich, weil die Substanz positive Pentosereaktionen gibt und ein Pentosazon liefert. Dies trifft selbstverständlich auch für die von mir und Raaschou dargestellte α-Guanylsäure zu. Daß weiter diese reduzierende Substanz eine Pentose und nicht Glucuronsäure oder eine Hexose sein kann, geht außerdem aus der fehlenden Tollensschen Naphthoresorcinreaktion sowie aus der fehlenden Lävulinsäurebildung nach Steudel hervor. Dagegen bekommt man ein typisches Pentosazon. Die Frage ist also nur noch, welches die Natur der Pentose ist. Neuberg sowie Rewald haben die aus Gesamtpankreas erhaltene Pentose mit Xylose identifiziert. Steudel konnte aus der Guanylsäure keine Xylonsäure darstellen. Bei meinen Untersuchungen bekam ich nach Bertrands Methode der Xylonsäuredarstellung

schließlich Krystalle eines Cadmiumsalzes, die auch eine recht schwer lösliche Brucinverbindung lieferten. Andererseits ging die Bromierung langsam von statten. Die Ausbeute war klein und die Krystalle nicht typisch. Da ich über keine Analysen verfüge, kann ich mich weder für noch gegen die Xylosenatur der Pentose entscheiden. Dagegen habe ich die Quantität des Zuckers sowohl für die α- wie β-Guanylsäure bestimmt, und zwar durch Titration nach meiner Methode. Zuerst habe ich durch Titrierungen mit reiner Xyloselösung festgestellt, wie sich diese bei meiner Titriermethode verhält.

0,2669 g Xylose in 50 ccm Wasser:

	Für Dextrose berechnet mg	Differenz mg
10 ccm = 2,0 ccm Hydroxylaminlösung = 53,4 mg Xylose	57,3	— 3,9
9 ccm = 4,7 ccm Hydroxylaminlösung = 48,0 mg Xylose	52,3	— 4,3
8 ccm = 8,6 ccm Hydroxylaminlösung = 42,7 mg Xylose	45,35	— 2,6
6 ccm = 17,1 ccm Hydroxylaminlösung = 32,0 mg Xylose	33,8	— 1,8
5 ccm = 22,0 ccm Hydroxylaminlösung = 26,7 mg Xylose	27,7	— 1,0
4 ccm = 27,5 ccm Hydroxylaminlösung = 21,4 mg Xylose	21,2	+ 0,2
3 ccm = 32,9 ccm Hydroxylaminlösung = 16,0 mg Xylose	15,3	+ 0,7
2 ccm = 38,5 ccm Hydroxylaminlösung = 10,7 mg Xylose	9,9	+ 0,6
1 ccm = 43,9 ccm Hydroxylaminlösung = 5,3 mg Xylose	5,0	+ 0,3

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Reduktion der Xylose je nach dem Zuckergehalt regelmäßiger als beim Traubenzucker verläuft, indem bei geringem Kupferüberschuß die Xylose stärker, bei großem schwächer als Dextrose reduziert. Die Oxydation entspricht ungefähr der Bildung von Trioxyglutarsäure. Der Unterschied zwischen Traubenzucker und Xylose kommt durch eine graphische Darstellung besser zum Ausdruck (Fig. 1).

0,4088 g α-Guanylsäure. 3 Stunden mit 5%iger H_2SO_4 100 ccm) gekocht. 10 ccm = 31,8 ccm Hydroxylaminlösung = 17 mg Xylose = 41,55%. 2,0143 g β-Guanylsäure 3 Stunden

mit 250 ccm 5%iger H_2SO_4 gekocht. 10 ccm = 22,6 ccm Hydroxylaminlösung = 26 mg Xylose = 32%. Auf aschefreie Substanz umgerechnet 41,0%.

Es bleibt noch zu untersuchen, inwieweit die gesamte reduzierende Substanz Pentose bzw. Xylose entspricht. Eine Portion β-Guanylsäure wurde mit Schwefelsäure 3 Stunden gekocht und auf 125 ccm aufgefüllt. 50 ccm dienten davon zur Furfurolbestimmung nach Tollens. Durch Reduktion gefunden 205,3 mg. Aus Furfurolbestimmung berechnet 195,3 mg. Hieraus muß gefolgert werden: 1. daß die gesamte reduzierende Substanz Pentose entspricht und 2. daß die ganze Zuckermenge durch 3stündige Hydrolyse mit 5%iger H_2SO_4 freigemacht wird. Steudel berichtet, daß er bei der Hydrolyse Furfurolbildung gefunden hat, also eine teilweise Zersetzung der Pentose. Dies mag sein, wenn man nicht das relative Verhältnis zwischen Guanylsäure und Säure, wie ich es in meiner ersten Mitteilung angewendet habe, berücksichtigt. Bei der Hydrolyse verdünnter Guanylsäurelösungen kommt aber eine Furfurolbildung nicht in Betracht. Aus diesem Grunde ist die Vorschrift Steudels zur Hydrolyse der Guanylsäure in Abderhaldens Handbuch nicht zu empfehlen.

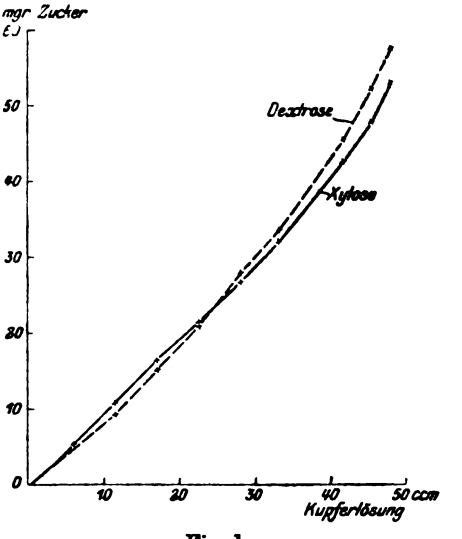


Fig. 1.

Das Vorkommen von Glycerin wird von Steudel sowie von v. Fürth und Jerusalem entgegen meinen Angaben verneint. Die Richtigkeit dieser Auffassung muß zugegeben werden. Es ist mir ganz unverständlich, denn ich habe damals besonders die Acroleinreaktion sehr deutlich nachweisen können und die Probe sogar Fachgenossen demonstriert. Trotzdem muß ich mich also jetzt unbedingt der entgegengesetzten Auffassung anschließen.

Zuletzt bleibt dann die Frage zu entscheiden: Sind Phosphorsäure, Guanin (und als sekundäre Produkte Xanthin und Ammoniak) und Pentose die einzigen Spaltungsprodukte der Guanylsäure oder kommen auch andere solche vor? Hierbei müssen wir auf der einen Seite die Spaltungsprodukte und andererseits die Elementaranalysen berücksichtigen. Nach den hier mitgeteilten Kontrolluntersuchungen finde ich keinen Grund, von meiner früher aufgestellten Elementarformel $C_{44}H_{66}N_{20}O_{34}$ Abstand zu nehmen. Zwar erklärt Steudel[1]) kategorisch, daß „nach seinen Untersuchungen" die Elementarformel der Guanylsäure einer „Richtigstellung" bedarf. Da aber diese Untersuchungen in einer Nachprüfung bestehen, bei der er meine Angaben — abgesehen von Glycerin — über den P- und N-Gehalt sowie die Guaninquantität bestätigt hat, während er keine C- und H-Analysen und keine Zuckerbestimmung ausgeführt hat, kann man wohl diese Äußerungen kaum ernst nehmen.

	Für α-Guanylsäure jetzt gefunden %	Für β-Guanylsäure jetzt gefunden %	Früher gefunden %	Für $C_{44}H_{66}N_{20}P_4O_{34}$ berechnet %
C	33,84	34,22	34,18	34,24
H	4,41	4,20	4,57	4,28
N	17,74	18,00	18,21	18,15
P	8,06	7,90	7,64	8,04

Da weiter die Guanylsäure nicht diffusibel ist, muß man ebenso wie bei der Thymusnucleinsäure eine Polyphosphorsäure als Kernsubstanz annehmen. Ich finde keinen Grund, meine frühere Auffassung zu ändern, daß auch die Guanylsäure, die betreffs Eigenschaften mit der Thymusnucleinsäre so viele Übereinstimmungen zeigt, 4 Atome P enthält.

Dagegen zeigen die Guanin- und Zuckerbestimmungen, daß die Guanylsäure 4 Moleküle Guanin, 4 Moleküle Pentose und 4 Moleküle Phosphorsäure enthalten muß. Dagegen kann man also nicht behaupten, daß hier — ebenso wie für die Inosinsäure jetzt allgemein behauptet wird — eine Nucleinsäure vorliegt, die aus 1 Molekül Guanin, Zucker und Phosphorsäure besteht. Auch kann man mit Bestimmtheit behaupten,

[1]) Steudel, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, 2, 2. H., S. 599.

daß außer den schon erwähnten Spaltungsprodukten auch andere solche vorliegen müssen. Es geht einfach nicht, wie Steudel es für die Thymusnucleinsäure versucht hat, eine Formel zu vindizieren, die nicht mit dem tatsächlichen analytischen Material übereinstimmt, aufzustellen. Nehmen wir für einen Augenblick an, daß die Guanylsäure nur aus 4 Mol. Guanin, 4 Mol. Pentose und 4 Mol. Phosphorsäure bestehe. Zur Hydrolyse müssen dann mindestens 8 Mol. Wasser mitgewirkt haben. Folglich müßte die Formel heißen: $C_{20}H_{20}N_{20}O_4 + C_{20}H_{40}O_{20} + H_{12}P_4O_{16} = C_{40}H_{72}N_{20}P_4O_{40} - 8\,H_2O = C_{40}H_{56}N_{20}P_4O_{32}$. Die elementare Zusammensetzung dieser Formel ist aber C 33,06%, H 3,86%, N 19,2%, P 8,53% gegenüber den gefundenen Werten: C 34,2%, H 4,3%, N 18,0%, P 8,0%. Steudels Befunde von 17,88% N und 7,52% P mit 1,5% N und 1,0% P weniger als die erste Formel es verlangt, sprechen, wie man sieht, gar nicht für diese, sondern für meine Elementarformel. Soweit ich sehe, läßt sich auch kaum eine wesentlich andere Formel aufstellen, die mit den analytischen Befunden übereinstimmt. Es fragt sich dann weiter, welche rationelle Zusammensetzung die Guanylsäure besitzt. Gefunden sind ca. 36 bis 37% Guanin und 40% Pentose, von der Phosphorsäure abgesehen. Für 4 Moleküle Guanin berechnet 39,17% und für 4 Moleküle Pentose dieselbe prozentische Menge. Wir können also festhalten, daß die Guanylsäure 4 Moleküle Guanin, 4 Moleküle Pentose, 4 Moleküle Phosphorsäure enthält. Zudem muß aber noch ein Bestandteil vorkommen. Aus der Elementarformel läßt sich weiter aussagen, daß dieser stickstofffrei sein muß. Dagegen muß er C, H und O enthalten.

Die Elementarformel ist	$= C_{44}H_{66}N_{20}P_4O_{34}$
4 (Guanin + Pentose + Phosphorsäure)	$= C_{40}H_{56}N_{20}P_4O_{32}$
Rest	$= C_4\,H_{10}\quad O_2$

Es bleibt also 1 C-Atom für jedes Guanin- resp. Pentosemolekül übrig. Es liegt dann nahe nachzusehen, ob hier nicht ein methyliertes Guanin oder eine Methylpentose vorliegen kann. Obwohl nach den Guaninanalysen höchst unwahrscheinlich, habe ich eine C-H-Bestimmung desselben (Rohguanin) ausgeführt. Gefunden 38,4% C gegen berechnet 39,7%. Von einem Epiguanin kann also keine Rede sein. Ebensowenig war die Fucose-, bzw. Rhamnosereaktion positiv. Weiter war es denkbar,

daß eine Fettsäure oder ein Alkohol, z. B. Äthylalkohol, vorliegen könnte. Es wurden deswegen mehrere recht große Guanylsäuremengen hydrolysiert und das Destillat untersucht. Mit völlig negativem Resultate (keine Jodoformreaktion, keine saure Reaktion). Es war weiter denkbar, daß eine Glucuronsäure vorliegen könnte, die, weil mit Phosphorsäure verbunden, bei der Hydrolyse in Xylose und Kohlensäure zerlegt würde. Eine Kohlensäureentwicklung findet aber nicht statt (Versuchsanordnung wie bei der CO_2-Bestimmung bei der Hydrolyse der Glucuronsäure nach Tollens). Tatsächlich haben alle diese Untersuchungen nur einen negativen Erfolg gehabt; sie zeigen, daß keine niedrigen Fettsäuren, nicht Äthylalkohol und Homologe und nicht Kohlensäure vorkommen können.

Dagegen bleibt die Möglichkeit offen, daß Methylalkohol gebildet werden kann, da dieser nicht mit Jod reagiert. Es wäre denkbar, daß eine Methylgruppe in glykosidartiger Bindung mit der Pentose vorkäme. Irgendwelcher Beweis hierfür ist aber nicht geliefert, und das letzte Spaltungsprodukt der Guanylsäure ist also noch unbekannt.

Hierbei begegnen wir einer neuen Übereinstimmung zwischen Guanylsäure- und Thymus-Spermanucleinsäure. Nach den Untersuchungen von Miescher, Schmiedeberg, mir u. a. ist die Elementarformel $C_{40}H_{56}N_{14}P_4O_{36}$ mit 37,65% C, 15,42% N und 9,75% P. Nach Abzug der mit Stickstoff (in den Purin- und Pyrimidinbasen) verbundenen C-Atome bleiben 20 bis 21 C-Atome zurück. Folglich muß außer der Hexose, von der höchstens 3 Moleküle vorkommen können, auch eine andere C-haltige, aber N-freie Substanz vorhanden sein. Steudel[1]) hat zwar versucht, durch Aufstellung einer Formel mit 43 C-Atomen diese Schwierigkeit zu umgehen. Diese Formel stimmt aber nicht gut mit der elementaren Zusammensetzung (37,18% C anstatt 37,65%, 15,18% N — 15,42% und 8,94% P — 9,75% P), und man ist nicht berechtigt, besonders von den von vielen Untersuchern gefundenen gut übereinstimmenden P-Analysen ohne weiteres Abstand zu nehmen.

Steudel[2]) hat ferner eine mit 57% Hexose übereinstimmende Lävulosemenge gefunden, während die theoretische Zucker-

[1]) Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 14, 1907.

[2]) Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 213, 1908.

menge 51,9% entspricht. Hierbei ist aber zu bemerken, daß er das Ätherextrakt ohne weiteres als Lävulinsäure berechnet und ferner die aus Rohrzucker gefundene Lävulinsäuremenge (34,8%) auf die Nucleinsäurehexose übergeführt hat. Eine solche Berechnung ist aber so unsicher, daß man daraus kaum mehr schließen kann, als daß jedenfalls viel Zucker vorkommen muß — ob drei oder vier Moleküle ist unentschieden.

Die Auffassung, daß nur drei Moleküle Hexose in der Thymusnucleinsäure vorhanden sind, findet eine Analogie in der Zusammensetzung der Tritikonucleinsäure von Osborne und Harris[1]), wo 3 Moleküle Pentose auf 4 P-Atome kommen. Da diese Nucleinsäure auch sonst eine beträchtliche Übereinstimmung mit der Thymusnucleinsäure zeigt (sie enthält Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil, Pentose und außerdem noch eine N-freie, C-haltige Verbindung unbekannter Natur), so kann der Zuckergehalt uns zur Vorsicht mahnen, daß man lieber das tatsächliche Analysenmaterial zugrunde legt, als die Formel allein nach der mehr unsicheren Quantität der Spaltungsprodukte aufstellt.

Durch die vorliegende Untersuchung ist erwiesen, daß die Guanylsäure eine Zwischenstellung zwischen der Inosinsäure und Thymusnucleinsäure einnimmt. Ihre Eigenschaften erinnern an die letztere, die Zusammensetzung an die Inosinsäure, obwohl sie doch etwas komplizierter zusammengesetzt ist als diese und wahrscheinlich ein größeres Molekulargewicht besitzt. Mit der Tritikonucleinsäure zusammen bilden sämtliche Nucleinsäuren eine Reihe von der einfachen Inosinsäure über die Guanylsäure und Tritikonucleinsäure zu der Thymusnucleinsäure. Aller Wahrscheinlichkeit nach sind diese Glieder nicht die einzigen Repräsentanten der Nucleinsäuren. Nach des Verfassers Erfahrung finden sich in den tierischen Organen auch andere. Besonders scheint es mir zweifelhaft, daß die sonst gefundenen Guanylsäuren mit der Pankreasguanylsäure identisch sind. Bei der Untersuchung von diesen hat man vielleicht zu großes Gewicht auf übereinstimmende Verhältnisse gelegt und dadurch die Unterschiede übersehen.

[1]) Osborne und Harris, Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 85, 1902.

Über die Beziehungen zwischen Tumorzellen und Blutserum.

Von

Ernst Freund und Gisa Kaminer.[1])

(Aus dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt Rudolfstiftung, Wien.)

(Eingegangen am 16. Mai 1910.)

Während die moderne Carcinomforschung sich hauptsächlich um die pathologische Erscheinungsweise des Tumorengiftes kümmert, liegen in bezug auf die Art und Weise der Disposition, die das eindringende Gift im Organismus findet, fast keinerlei Arbeiten vor. Es muß dies um so auffallender erscheinen, als nicht nur die medizinischen Erfahrungen aus ältester Zeit, sondern auch die Forschungen der neuesten Zeit an der Annahme einer Disposition festzuhalten zwingen. Die Gründe der medizinischen Erfahrungen scheinen uns darin gelegen zu sein, daß trotz Jahrhunderte sichergestellter Beobachtung sich nicht das Vorurteil der Ansteckungsfähigkeit ausgebildet hat und auch die jüngere medizinische Literatur mit ihrem reichen Material an Carcinomoperationen keine sichergestellten Fälle von Ansteckung meldet. Auch die modernen Impfstudien über Carcinom haben trotz ihrer überraschenden Erfolge doch immer wieder erkennen lassen, daß es bei einer bestimmten Spezies doch immer Tiere gibt, die einer Infektion Widerstand leisten.

Die nachfolgenden Mitteilungen erstrecken sich nur auf Studien bezüglich des Einflusses, den das Serum carcinomfreier resp. carcinomatöser Individuen auf Tumorenzellen ausübt.

---

[1]) Vorläufige Mitteilung: Sitzg. d. k. k. Gesellsch. d. Ärzte in Wien vom 4. März 1910. Wiener klin. Wochenschr. 1910, Nr. 10.

Bedenkt man, mit welch erschreckender Raschheit Metastasen durch Zellverschleppung bei carcinomatösen Individuen zustande kommen können und vergleicht damit, wie andererseits in wenigen Tagen nach Impfung eines nußgroßen Tumorstückes in einen nicht disponierten Organismus derselben Tierspezies die Zellen total verschwunden sind, so liegt die Annahme nahe, daß in der Gewebsflüssigkeit der verschiedenen Organismen eminent carcinomzerstörende resp. -erhaltende Substanzen vorhanden sein müssen.

Auf Grund dieser Vorstellung haben wir uns vorgenommen, Zellen von Tumoren unter möglichst sterilen Bedingungen der Einwirkung des Serums carcinomatöser und carcinomfreier Individuen auszusetzen und dabei zu beobachten, ob und welche Veränderungen zutage treten.

Versuchsanordnung.

a) Zellmaterial.

Die Schwierigkeiten, die sich bei Beschaffung frischen Operationsmateriales boten, veranlaßten uns, die ersten Versuche mit Leichenmaterial vorzunehmen; ein Umstand, der, wie sich später erwies, für unsere Versuche günstig war, weil frisches Operationsmaterial der Gewinnung isolierter Zellen, wie wir sie brauchten, weit größere Schwierigkeiten entgegensetzte als Leichenmaterial. Die Tumoren, von denen nach flüchtiger mikroskopischer Untersuchung möglichst nicht degenerierte Stücke zur Verwendung gelangten, wurden nach vorhergegangener Zerkleinerung mit Schere und Messer in ein Preßtuch eingewickelt und unter Wasser mit einem Gehalt von 0,6% ClNa + 1% FlNa mit den Händen gepreßt, wobei das Bindegewebe und die Blutgefäße zurückblieben, während die Zellen größtenteils ungeschädigt durch die Poren des Tuches durchtraten. Aus der so erhaltenen Zellaufschwemmung wurden die Zellen durch Zentrifugieren gesammelt und mit einer 0,6%igen Kochsalzlösung 2 bis 3 mal gewaschen. Das zuletzt erhaltene Zentrifugat wurde in einem gleichen Volumen einer 0,6%igen Kochsalzlösung aufgeschwemmt und die so erhaltene Zellaufschüttlung durch Zusatz von FlNa auf einen Gehalt von 1% FlNa gebracht. In einer Reihe von Fällen aber hat es sich gezeigt, daß durch das Waschen sowohl mit 0,6%iger als auch mit konzen-

trierter Kochsalzlösung, wie auch mit Lösungen mit schwefelsaurem Natron die Zellen agglutinierten, ja selbst zu gelatinösen Klumpen sich umwandelten; so daß wir in solchen Fällen uns nur mit einer einmaligen Waschung begnügen mußten. Es hat sich gezeigt, daß dieser FlNa-Gehalt die Zellen bis zu 3 Wochen ohne schädigende Wirkung aufbewahrt. In gleicher Weise haben wir uns Zellmaterial von Organen carcinomfreier Individuen verschafft. Bei diesen, oft an Blutkörperchen reicheren Zellpressaten genügte eine einmalige Auswaschung mit destilliertem Wasser, um sich dieser störenden Beimengung zu entledigen.

Bei der Durchführung dieses Vorgehens an Tumoren, die frisch durch Operation gewonnen waren, zeigte sich zu unsrer unangenehmsten Überraschung, daß die Zellen nach kurzer Zeit verklebt waren, so daß eine Zählung derselben unmöglich schien. Es gelang uns nicht, diese einer Gerinnung ähnlich sehende Erscheinung durch Hinzufügen von oxalsaurem resp. citronensaurem Salz hintanzuhalten.

Eine Wiederholung des Auspressens ergab nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen, was sich um so unangenehmer bemerkbar machte, weil das Operationsmaterial gewöhnlich zellarmer Scirrhus war. Es war uns nicht möglich zu unterscheiden, ob diese Erscheinung als allgemeine Eigenschaft jedes operierten Materials aufzufassen sei oder auf Rechnung des histologischen Baues, der uns zur Verfügung gestandenen plattenepithelialen histologischen Form zu setzen sei. — Der Versuch, Operationsmaterial etwas länger liegen zu lassen, führte zu keinem günstigeren Resultat; doch erhielten wir bei einem operierten Magencarcinom durch besonders langes Waschen mit ClNa sehr verwendbare Zellen.

b) Serum.

Das Serum wurde teils von Leichen, teils von Lebenden auf die übliche Weise gewonnen. Hie und da haben wir dasselbe zur besseren Konservierung bei späteren Versuchen mit einem Zusatz des $^1/_{10}$ Volumens einer $5\,^0/_0$igen Fluornatriumlösung versetzt.

Nachdem wir anfangs für unsere Versuche Glascapillaren verwendet hatten, haben wir schließlich kleine Eprouvetten mit

Gummistöpsel benutzt und zunächst 10 Tropfen Serum und 1 Tropfen Zellaufschüttlung vermischt, 1 Tropfen einer 5%igen FlNa-Lösung zugefügt und gut gemischt; in 1 Tröpfchen dieser Mischung wurden in der Thoma-Zeißschen Zählkammer die Zellen gezählt, die Eprouvette samt Inhalt auf 24 Stunden in einem Brutschrank bei 40° stehen gelassen und eine abermalige Zählung vorgenommen.

Unser Wunsch, die Einwirkung des Serums auf die Carcinomzellen zu untersuchen, ließ es notwendig erscheinen, die Zellen nicht nur qualitativ zu prüfen, sondern auch deren Zahl zu bestimmen; mit Rücksicht darauf haben wir die Mischung so gewählt, daß eine Zählung in der Thoma-Zeißschen Zählkammer leicht möglich war. Sehr praktisch erwies sich die Mischung, wenn in einem großen Quadrate ca. 20 Zellen zählbar waren.

Bei einer Reihe von Versuchen hat sich sogar gezeigt, daß ein Mehr an Zellen von ungünstigem Erfolg für den Ausgang des Versuches ist. Eine Serummenge, die mit 40 Zellen ein negatives Resultat gab, ergab mit 20 Zellen ein positives Resultat.

Für die Beantwortung dieser Frage war es daher besonders wichtig, daß der Inhalt der Eprouvette während des Versuches keiner zufälligen Änderung in bezug auf die Konzentration unterliege.

Versuche mit Serum nicht carcinomatöser Individuen.

Schon die ersten Versuche, die wir mit „carcinomfreiem" Serum ausführten, haben das interessante Resultat gezeigt, daß die Mehrzahl der Zellen zugrunde ging. Mit Rücksicht darauf mußte zunächst festgestellt werden, ob diese Zellen nicht bei 40° auch ohne Zusatz von Serum zugrunde gehen. Wir haben daher die Zellaufschüttlung mit der entsprechenden Menge einer 0,6%igen Kochsalzlösung, die 0,3% FlNa enthielt, 24 Stunden der Bruttemperatur ausgesetzt und konnten konstatieren, daß dabei die Zahl der Zellen nicht im geringsten abnahm.

Wir haben dann das Serum auf 55° erhitzt und ebenfalls konstatieren können, daß die Zellen in diesem Serum unverändert blieben. Durch diese Versuche war uns klargestellt, daß das Serum nicht carcinomatöser Individuen eine koktolabile

Substanz enthalte, die imstande ist, carcinolytisch zu wirken. Um so wichtiger mußte es uns erscheinen, daß die Versuche, die mit Carcinomserum und demselben Carcinommaterial angestellt wurden, ergaben, daß die Zellen nach 24stündigem Verweilen im Brutofen an Zahl nicht abgenommen hatten. Mit Rücksicht auf dieses Resultat haben wir unser ursprüngliches Programm dahin geändert, daß wir nicht so sehr auf die histologischen Veränderungen, sondern hauptsächlich auf die quantitativen Änderungen Rücksicht nahmen.

Die nächste Frage, die sich uns aufdrängte, war danach gerichtet, ob das vom Normalen abweichende Verhalten des Carcinomserums sich etwa nur bei einer bestimmten histologischen Form des Carcinoms zeigt oder auch bei verschiedenen Formen.

Tabelle I.

Tabelle über das Verhalten eines Carcinommaterials gegenüber verschiedenen „carcinomatösen" resp. „carcinomfreien" Seris.

Zellmaterial	„Carcinomatöse" Sera							„Carcinomfreie" Sera						
	Ca. uteri	Ca. mamae	Epitheliom	Ca. ventriculi (Leiche)	Ca. ovarii (Leiche)	Ca. uteri (Leiche)	Ca. oesophagi	Schlaganfall	Tbc. (Leiche)	Kyphoskoliose (Leiche)	Nephritis I	Pneumonie	Lues	Nephritis II
Carcinommetastase von Leber (Ca. VI)	bleibt erhalten							wird zerstört						

Es ergibt sich demnach, daß tatsächlich ein und dasselbe Carcinommaterial den verschiedenen „carcinomatösen" resp. „carcinomfreien" Seris gegenüber dasselbe Verhalten zeigt.

Nach diesen Feststellungen wurden Untersuchungen angestellt über das Verhalten der Sera gegenüber normalen Zellen. Wir haben als Typus normaler Zellen Leberzellen gewählt und diese in der früher beschriebenen Weise mit

a) Serum carcinomatöser Individuen,

b) Serum carcinomfreier „ geprüft.

Wie aus den Tabellen II und III ersichtlich ist, werden Leberzellen weder von dem Serum carcinomatöser noch carcinomfreier Individuen angegriffen.

Es sei besonders darauf hingewiesen, daß in den obigen Versuchen nicht das eigene Serum auf seine Zellen zur Einwirkung gebracht wurde, sondern stets das Serum fremder Individuen.

Für die Auffassung des von uns mit besonderem Interesse verfolgten Verhaltens des normalen Serums gegenüber Carcinomzellen hatten diese Versuche eine ganz besondere Bedeutung, weil sie alle Annahmen, daß es sich um autolytische oder heterolytische Prozesse handle, überflüssig machten und schließen ließen, daß das Auflösungsvermögen für Tumorzellen eine ganz spezifische Eigenschaft des normalen Serums sei. Würde der Vorgang auf einer Autolyse beruhen, dann müßten auch die normalen Zellen angegriffen werden. Da aber speziell Carcinomzellen zur Lösung gebracht wurden, mußte man an eine von der Autolyse unabhängige Fähigkeit denken. Und es entstand dabei die Frage, ob das beobachtete Ergebnis der Zellzerstörung die Folge einer besonderen zerstörenden Kraft des Serums oder einer speziellen Labilität der Zellen sei.

Wenngleich man für den ersten Augenblick das Zerfallen der Tumoren auf die Erscheinung der Labilität des Carcinomtumoren zurückführen möchte, haben wir doch mit Rücksicht auf das Erhaltenbleiben der Carcinomzellen im Carcinomserum gegenüber annehmen zu müssen geglaubt, daß die Lösung der Zellen auf eine besondere Wirkung des Serums zurückzuführen sei.

Einen bestimmten Nachweis für diese Annahme erhielten wir durch die Versuche, daß Serum, das durch Erhitzen auf 60° inaktiviert ist, unter gleichen Verhältnissen wirkungslos ist.

Tabelle II.

Tabelle über die Wirkung „carcinomfreier" Sera auf Leberzellen carcinomatöser und nicht carcinomatöser Individuen.

Sera	Leberzellen Carninomfreier				Leberzellen Carcinomatöser		
	Cirrhose	Nephritis	Pneumonie	Tuberkulose	Ca. ventriculi	Ca. uteri	Ca. recti
Nephritis	zerstört	zerstört	zerstört		zerstört		zerstört
	nicht	nicht	nicht		nicht		nicht
Schlaganfall	zerstört		zerstört			Resultat	
	nicht		nicht			zweifelh.	
Pneumonie			zerstört	zerstört			
			nicht	nicht			
Empyem	zerstört					zerstört	
(Leiche)	nicht					nicht	
Nephritis	zerstört			zerstört			zerstört
(Leiche)	nicht			nicht			nicht

Tabelle III.

Tabelle über die Einwirkung „carcinomatöser" Sera auf Leberzellen Carcinomatöser und nicht Carcinomatöser.

Sera	Leberzellen carcinomfreier Patienten			Leberzellen carcinomatöser Patienten		
	Nephritis	Pneumonie	Cirrhose	Ca. ventriculi	Ca. uteri	Ca. recti
Ca. ventriculi op.	zerstört nicht	zerstört nicht			zerstört nicht	
Ca. mamae op.		zerstört nicht			zerstört nicht	zerstört nicht
Ca. ventric. (Leiche)			zerstört nicht			
Ca. mamae op.	zerstört nicht					
Ca. ventric. (Leiche)				zerstört nicht		
Ca. hepatis (Leiche)					zerstört nicht	
Ca. mamae op.				zerstört nicht		zerstört nicht

Nach dieser Feststellung haben wir das Verhalten des carcinomatösen Serums normalen Zellen gegenüber studiert.

Diese Untersuchung hat sich ebenfalls in zwei Teile geteilt, da es sich einerseits um die Einwirkung auf Leberzellen nicht carcinomatöser, andererseits carcinomatöser Individuen handelte.

Rekapitulieren wir, so ergibt sich, daß Serum nicht Carcinomatöser in seiner Wirkung auf Zellen sich vom Serum Carcinomatöser unterscheidet.

Zellen	Sera carcinomfreier Patienten	Sera carcinomatöser Patienten
Ca.-Zellen	werden gelöst	bleiben erhalten
Leberzellen von carcinomatösen Individuen	bleiben erhalten	bleiben erhalten
Leberzellen von carcinomfreien Individuen	bleiben erhalten	bleiben erhalten

Auf Grund dieses Verhältnisses haben wir nun versucht, den Träger dieser Eigenschaften zu isolieren.

Zunächst haben wir uns überzeugt, daß die Substanz nicht dialysabel ist.

Bei der Fällung des Serums mit der doppelten Menge Alkohol fand sich die wirksame Substanz im Alkoholnieder-

schlag und bei einem Versuch der Eiweißfraktionierung hauptsächlich in der Albuminfraktion. Wir haben dann versucht, die wirksame Substanz von den Eiweißkörpern zu isolieren.

Schon der erste Versuch, diese Substanz mit Äther aus dem Serum zu extrahieren, zeigte ein sehr günstiges Resultat. Der Ätherrückstand mit einer 1%igen Na_2CO_3-Lösung aufgeschüttelt, zeigte nicht nur überhaupt zerstörende Wirkung auf Zellen, er repräsentierte, wie sich bei genügender Verdünnung zeigte, fast die ganze zerstörende Wirkung, die die entsprechende Serummenge hatte, während das ausgeschüttelte Serum fast gar keine Wirkung auf die Zellen äußerte. Wir haben uns selbstverständlich überzeugt, daß die verwendete Na_2CO_3-Lösung in den obigen Fällen ohne zerstörende Einwirkung auf die Zellen war.

Die weiteren Versuche, die Substanz zu isolieren, haben zunächst gezeigt, daß der Ätherrückstand sowohl an ClNa-Lösung, als auch an Na_2CO_3-Lösung Substanzen abgibt, die keine zellzerstörende Kraft besitzen, während die bei den Emulsionen solcher Lösungen an der Oberfläche der Mischung schwimmenden fettigen Tröpfchen, abfiltriert und wieder mit Na_2CO_3-Lösung emulgiert, die zerstörende Wirkung zeigten. Man kann daraus wohl schließen, daß Spuren von Seifen und Fettsäuren, die im Ätherextrakte vorhanden sein mochten, an der zellzerstörenden Wirkung unbeteiligt seien.

Die weiteren Untersuchungen bezogen sich darauf, ob die derzeit bekannten Bestandteile der Lipoidsubstanz: Lecithin, Cholesterin usw., qualitative oder quantitative Änderungen zeigen. Zu diesem Zwecke wurden Blutserum von „Carcinomfreien" und „Carcinomatösen" folgender Behandlung unterzogen: Von gleichen Quantitäten Seris wurde durch Ausschütteln mit Äther der Ätherextrakt gewonnen, der größte Teil des Äthers abgedunstet und zu der restierenden, nun konzentrierten Lösung das 3 bis 4 fache Volumen Aceton zugesetzt. Während beim normalen Serum ein deutlicher Niederschlag entstand, zeigte sich beim Carcinomserum nur eine leichte Opalescenz. Die Filtrate wurden eingedampft, verseift und wieder mit Äther ausgeschüttelt; Cholesterinreaktion mit diesen Ätherauszügen zeigte die gleiche Stärke. Es ergab sich also bei gleichem Cholesteringehalt ein verminderter Lecithingehalt des Carcinomserums gegenüber dem „carcinomfreien" Serum.

Weitere Versuche haben gezeigt, daß sich auch aus Pferdeserum durch Ätherextraktion eine solche zellzerstörende Substanz darstellen läßt.

Mit der Feststellung des Mangels dieser Substanz im Serum Carcinomatöser erschien uns der Gegensatz im Verhalten der Sera gegenüber Carcinomzellen noch nicht völlig klargestellt. Es wäre möglich gewesen, daß nicht nur eine zerstörende Substanz fehlt, sondern auch eine schützende Substanz vorhanden ist.

Für den Nachweis einer solchen schützenden Substanz war es naturgemäß notwendig, zerstörende Substanzen in kleinen Dosen auf die Zellen einwirken zu lassen. Für die Erzeugung solcher kleinen Dosen war uns ein Serumverdünnungsversuch sehr behilflich. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß normales (resp. carcinomfreies) Serum zur Hälfte verdünnt werden kann, ohne daß die zerstörende Wirkung erlischt. Wir haben nun versucht, normales Serum statt mit ClNa-Lösung mit Carcinomserum zu verdünnen, und dabei fanden wir, daß die zerstörende Wirkung schon bei einer Mischung von 2 Teilen Carcinomserum mit 3 Teilen normalem Serum erloschen war. Wir müssen daher den Schluß ziehen, daß das Carcinomserum auch eine aktive zellschützende Substanz enthält. Weitere Versuche haben gezeigt, daß diese zellschützende Substanz durch Alkohol zu fällen ist und dieser Fällung durch Na_2CO_3 entziehbar ist, daß diese Substanz an der Euglobulinfraktion hängt und in Äther unlöslich ist. Zur Erklärung dieses Phänomens seien noch Versuche angeführt, bei denen wir Serum von Carcinomatösen resp. von Carcinomfreien mit Kochsalzextrakten von Tumoren vermischten. Bei diesen Versuchen ergab sich nun tatsächlich darin ein prägnanter Unterschied, daß das Carcinomserum mit diesen Lösungen Präcipitate ergab, während carcinomfreie Sera klar blieben.

Gleichzeitig mit dem Bestreben der Isolierung haben wir an einer ziemlich großen Anzahl von Blutproben festzustellen versucht, ob sich das differente Verhalten des Serums „Carcinomatöser" resp. „Carcinomfreier" zu diagnostischen Zwecken verwenden läßt.

Bei der Durchführung dieser Versuche haben sich eine Reihe von Schwierigkeiten ergeben, die sich sowohl auf die Zellen, als auch auf das Serum beziehen.

A. Material.

Nicht jedes Carcinommaterial ist für diese Versuche praktisch verwendbar. Besonders schlecht zu gebrauchen sind scirrhöse Formen sowie medullär erweichte Massen. Als gut verwendbar haben sich Randpartien medullärer Formen erwiesen, die noch wenig degenerirte Zellen enthielten, da diese beim Durchpressen der Zellen zu viel Detritus erzeugen und die Zählung ungenau machen. Außerdem erscheint es empfehlenswert, die Tumoren möglichst bald nach dem Tode zu entnehmen und rasch zu verarbeiten. Es hat den Eindruck gemacht, daß in einzelnen Fällen, wo dies nicht beachtet wurde, störende autolytische Vorgänge zu beobachten waren. Es erschien uns daher nötig, bei der Prüfung eines Serums 3 Proben aufzustellen, und zwar mit dem zu untersuchenden Serum mit normalem Serum und mit physiologischer Kochsalzlösung.

B. Serum.

Das Serum soll frisch sein, erhält aber seine Wirkung in der Kälte durch ca. 8 Tage, während es der Zimmertemperatur ausgesetzt in 1 bis 2 Tagen seine Wirkung verliert. Ein Gehalt von FlNa bis 0,5% schadet dem Serum nicht.

Es ist auch zweckmäßig, das Blut einige Stunden nach der Gewinnung stehen zu lassen, weil sonst Spätgerinnungen einer Zellzählung hinderlich waren.

Zur Verwendung kam sowohl Blut Lebender als auch Leichenblut, und wie folgende Tabelle (V) zeigt, löst das Serum carcinomfreier Individuen Carcinomzellen, während Carcinomserum diese Zellen unverändert läßt. Doch sei dabei erwähnt, daß in vier Fällen das Resultat nicht übereinstimmte insofern, daß das Blut eines Ekzematösen und eines Tuberkulösen Carcinomzellen nicht zerstörte, während zwei Carcinomsera Carcinomzellen, wenn auch unvollständig, zerstörten.

Fassen wir unsere Ergebnisse kurz zusammen, so ergibt sich:

A. Das Serum carcinomfreier Individuen zerstört die Carcinomzellen, läßt aber sowohl die Organzellen Carcinomatöser als Carcinomfreier unverändert. Der Träger dieser Wirkung ist eine Substanz, die

1. nicht dialysabel ist,
2. durch Alkohol fällbar,

Tabelle
+ = zerstört
— = erhält

Zellmaterial	Carcinomsera.																	
	Magen-Ca. (lebend)	Magen-Ca. (Leiche)	Mama-Ca. (lebend)	Epitheliom (lebend)	Magen-Ca. (lebend)	Mama-Ca. (lebend)	Leber-Ca. (Leiche)	Uterus-Ca. (lebend)	Magen-Ca. (Leiche)	Epitheliom (lebend)	Uterus-Ca. (Leiche)	Oesophagus-Ca. (lebend)	Ca. ovarii (lebend)	Mama-Ca. (lebend)	Ca. uteri (Leiche)	Oesophagus-Ca. (Leiche)	Ca. uteri (lebend)
Carcinom I. Drüsenmetastase (Leiche)	—	—	—	—						—							—
Ca. II. Lebermetastase (Leiche)		—		—	—		—										
Ca. III. Drüsencarcinom (Leiche)	—		—			—				—							
Ca. IV. Magencarcinom (Leiche)		—		—			—					—		—			
Ca. V. Drüsenmetastase (Leiche)	—				—	—			—								
Ca. VI. Metastase in der Leber (Leiche)				—	—		—		—	—	—	—	—		—		
Ca. VII. Magencarcinom (Leiche)	—			—		—		—		—							
Ca. VIII. Rectumcarcinom (Leiche)									—			—					
Ca. IX. Magencarcinom (operiert)					—	—		—			—		—				
Ca. X. Drüsenmetastase (Leiche)						—			—		—	—				—	
Ca. XI. Carcinoma uteri (Leiche)									—		—						
Ca. XII. Carcinoma oesophagi (Leiche)										—	—		—			—	
Ca. XIII. Lebercarcinom (Leiche)						—	—					—		—		—	—
Ca. XIV. Drüsenmetastase (Leiche)					—					—			—			—	—

V.
die Zellen
die Zellen.

Sera nicht Carcinomatöser.

Nephritis akut (lebend)	Pneumonie (Leiche)	Myelom (Leiche)	Gelenk-rheumatismus (lebend)	Nephritis (lebend)	Pneumonie (lebend)	Sarkom (Leiche)	Leukämie (Leiche)	Icterus kat. (lebend)	Knochensarkom (Leiche)	Schlaganfall (lebend)	Lues (lebend)	Sarkom (lebend)	Perniz. Anämie (Leiche)	Lues (lebend)	Lymphosarkom (Leiche)	Tbc. (Leiche)
+	+	+	+		+											
+		+			+		+	+		+						
+						+	+	+		+	+					
+	+		+		+											
		+						+		+						
				+	+	+			+	+	+					
			+			+			+			+				
								+		+	+	+	+			
								+	+			+	+	+	+	
				+		+	+	+			+		+	+		
		+	+		+	+			+		+		+			
												+	+	+	+	
												+	+			
								+	+			+	+		+	+

3. durch Erhitzen auf 55° zerstörbar,

4. in Äther löslich,

5. nach Entätherung in Alkohol löslich ist.

Der Ätherextrakt kann mit Kochsalzlösung gewaschen werden.

(Zellen allein in 1% igen ClNa-, FlNa- und 0,1% igen Na_2CO_3-Lösungen halten sich eine Zeitlang ungeschädigt.)

6. Ein Zusatz von 1% FlNa hemmt die zerstörende Wirkung nicht.

7. In einer Verdünnung mit 2 Teilen Serum, 3 Teilen 0,6% iger ClNa-Lösung ist die zerstörende Wirkung aufgehoben.

8. Auf die Hälfte verdünnt, behält das Serum seine zerstörende Kraft.

B. Das Serum carcinomatöser Individuen zerstört Carcinomzellen nicht, läßt aber auch die Organzellen Carcinomatöser, als auch Carcinomfreier unverändert.

1. Der Ätherextrakt des Carcinomserums zeigt keine zerstörende Wirkung auf Zellen; die zerstörende Substanz ist nicht nachweisbar.

2. Die erhaltende Komponente scheint eine aktive Substanz zu sein, da das Carcinomserum die zellzerstörende Wirkung des normalen Serums aufzuheben vermag.

Wir sind weit davon entfernt, ein abschließendes Urteil zu fällen, dennoch haben wir uns zur Publikation entschlossen, um an einem größeren Material die Verwendbarkeit unserer Beobachtungen nachprüfen zu können. Unsere weiteren Versuche werden sich darauf erstrecken, inwieweit die gefundenen Resultate eine Disposition darstellen.

Über eine einfache Darstellung von reinem Cyanamid.

Von

Fritz Baum.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

(Eingegangen am 29. Mai 1910.)

Durch seinen, bereits von seinen Entdeckern beobachteten leichten Übergang in Harnstoff hat das im Jahre 1851 von Cloez und Canizzaro[1]) aufgefundene Cyanamid sogleich das lebhafte Interesse der physiologischen Chemiker erweckt. Wenn auch Spekulationen über die Rolle, die es als Anhydrid des Harnstoffs im Stoffwechsel spielen könnte[1a]), sich als nicht stichhaltig erwiesen haben, so wurden dafür durch Arbeiten von Baumann[2]) und insbesondere durch die klassischen Untersuchungen von Drechsel[3]) die genetischen Beziehungen zwischen beiden Körpern und der Carbaminsäure, als deren Amid und Nitril beide erscheinen, genau festgestellt, ebenso das interessante chemische Verhalten des Cyanamids und neue Darstellungsmethoden desselben aufgefunden. Anderseits gelang mit seiner Hilfe durch die Strecker-Vollhardsche[4]) Methode die glänzende Synthese des Kreatins, zu der sich die Synthese des Guanidins von Erlenmeyer[5]) gesellte. Diese Brauchbarkeit des Cyanamids für synthetische Zwecke gewinnt besonders an Bedeutung, da ja später auch unter den Spaltungsprodukten des Eiweißes direkt ein Ab-

[1]) Compt. rend. 32, 62; Ann. 78, 223, 1851.

[1a]) Vgl. Nencki, Ber. 5, 893.

[2]) Ber. 6, 1373; 8, 709.

[3]) J. pr. Ch. [2], 11, 284; 16, 207; 21, 77.

[4]) Strecker, Compt. rend. 52, 1212. — Vollhard, Sitzungsber. d. Münch. Akad. 2, 472, 1868.

[5]) Annal. 146, 258.

kömmling des Guanidins, das Arginin, aufgefunden worden ist, und es unterliegt kaum einem Zweifel, daß bei den zurzeit in ausgedehntem Maßstab gepflegten Versuchen über Synthese und Verkuppelung von Aminosäuren dem Cyanamid noch die Rolle eines sehr nützlichen Werkzeugs zufallen dürfte.

Eine einfache, sichere und wohlfeile Darstellung desselben, wie sie im folgenden beschrieben werden soll, dürfte deshalb manchem willkommen sein. Es wird aber auch vielleicht von Nutzen sein, zuvor eine kritisch gesichtete, gedrängte Übersicht über die bekannten Darstellungsmethoden und das chemische Verhalten des Cyanamids zu geben, dessen genaue Kenntnis nicht nur bei seiner Bereitung, sondern auch bei seiner Verwendung zu synthetischen Zwecken sorgfältig im Auge zu behalten sein wird.

Cloez und Canizzaro[1]) erhielten das Cyanamid durch Wechselwirkung zwischen Ammoniak und Chlorcyan in ätherischer Lösung in vorzüglicher Reinheit als farblose, luftbeständige, in Wasser, Alkohol, Äther sehr leicht lösliche Krystalle vom Schmelzpunkt 40°, die beim Erhitzen auf etwa 150°, sowie beim Eindampfen der wässerigen Lösung, besonders unter Zusatz von etwas Alkali, sich in das dimere Dicyandiamid verwandelten, und die durch Einwirkung von etwas Salpetersäure auf die ätherische Lösung Harnstoff gaben. Beilstein und Geuther[2]) beobachteten dann die Bildung von Cyanamid beim Erhitzen von Natriumamid im Kohlensäurestrom, konnten es aber nicht isolieren, sondern nur durch die charakteristische, von ihnen entdeckte, in verdünnter Salpetersäure leicht lösliche, in Ammoniak fast unlösliche gelbe Silberverbindung $Ag_2N.CN$ nachweisen. Drechsel[3]) zeigte sodann, daß bei dieser Reaktion zuerst carbaminsaures Natrium entsteht, das beim Erhitzen unter Wasserabspaltung in cyansaures Natrium übergeht, und daß dieses sodann mit weiterem Natriumamid unter neuerlicher Wasserabspaltung Cyanamidnatrium liefert: $NH_2COONa \longrightarrow NCONa$; $NCONa + NH_2Na = H_2O + CN.NNa_2$. Letztere Reaktion läßt sich direkt mit gutem Erfolg ausführen. Der Zerfall der carbaminsauren Salze beim Erhitzen in isocyansaure Salze ist ganz allgemein. Mit Ausnahme der beim Erhitzen beständigen Alkalisalze gehen aber die anderen isocyansauren Salze bei weiterem Erhitzen unter Kohlensäureabspaltung in die sehr beständigen Erdalkalicyanamide über: $Ca(NCO)_2 = CO_2 + CaN.CN$. Nach Drechsel[4]) zerfallen diese zweiwertigen Erdalkali- und Alkalicyanamide mit Wasser sofort in freies Alkali und die einwertigen Salze $NaHN.CN$ resp.

[1]) l. c.
[2]) Annal. 108, 93.
[3]) J. pr. Ch. [2] 16, 203.
[4]) J. pr. Ch. [2] 11, 307; 21, 77.

$Ca(HNCN)_2$, und sind auf nassem Wege nicht darstellbar; dagegen geben Cyanamidlösungen mit Silber-, Kupfer-, Blei- und Quecksilbersalzen ausschließlich die zweiwertigen Metallverbindungen $Me_2N.CN$.

Da die bei der Herstellung von Sulfoharnstoff durch Erhitzen von Rhodanammonium resultierenden Rückstände nach Vollhard auf cyansaures Kalium verarbeitet werden können, eignen sie sich nach Drechsel[1]) auch direkt zur Gewinnung von Cyanamid durch Glühen mit Kalk. Ähnlich entsteht Calciumcyanamid beim Glühen von Harnstoff und zahlreicher anderer Verbindungen mit der Gruppe —NCO mit Kalk, eine Reaktion, die durch den sehr empfindlichen Nachweis mittels der Silberprobe mit Zentigrammen, selbst Milligrammen Substanz ausführbar ist (Emich).[2])

Die lange vergeblich versuchte direkte Wasserentziehung[3]) aus Harnstoff unter Cyanamidbildung gelingt nach Fenton[4]) durch Erhitzen mit Natrium und soll befriedigende Ausbeuten liefern. Nach Moureu[5]) wirkt Thionylchlorid heftig auf Harnstoff ein, und es läßt sich Cyanamid im Reaktionsprodukt durch die charakteristischen Schwermetallsalze nachweisen; als Darstellungsmethode kommt dies wohl nicht in Betracht.

Viel leichter als das Wasser aus Harnstoff läßt sich Schwefelwasserstoff aus Thioharnstoff abspalten. Der Entdecker desselben, Reynolds, erhielt dabei Harnstoff, A. W. Hoffmann[6]) Dicyandiamid, das er aber als sekundäres Produkt aus dem zuerst gebildeten Cyanamid ansah. Baumann[7]) fand den leichten Übergang des Cyanamids durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in seine ätherische Lösung in Thioharnstoff, und bewies, daß dieser beim Entschwefeln mit Quecksilberoxyd in alkoholischer Lösung in Cyanamid übergeht. Die Isolierung des letzteren gelang Vollhard[8]), der zeigte, daß die Entschwefelung noch besser in wässeriger Lösung sich vollzieht, und daß aus dieser Lösung, der das Cyanamid wegen seiner enormen Löslichkeit durch Ausäthern, auch nach Sättigen mit Natriumsulfat, nicht entzogen werden kann, durch rasches Eindampfen unter Zusatz von etwas Essigsäure bis zum Erstarren einer Probe beim Abkühlen reines Cyanamid gewonnen wird, das durch Umlösen aus Äther von den stets gebildeten geringeren oder größeren Mengen Dicyandiamid befreit wird. Diese Methode hat lange Zeit das Laboratorium beherrscht. Außer einigen unwesentlichen Abänderungsvorschlägen[9]) ist von Traube[10]) besonders der Zusatz von wenig Rhodan-

[1]) J. pr. Ch. [2] 21, 79.
[2]) Monatsh. f. Chem. 10, 332.
[3]) Weltzien, Annal. 107, 219. — Drechsel, J. pr. Ch. [2] 11, 288.
[4]) Journ. of Chem. Soc. 41, 262, 1881.
[5]) Bull. de la soc. chim. [3] 11, 1068.
[6]) Ber. 2, 605.
[7]) Ber. 6, 1375.
[8]) Ber. 7, 101.
[9]) Mulder und Smith, Ber. 7, 1636.
[10]) Ber. 18, 461.

ammon zum Thioharnstoff empfohlen worden. Eine wesentliche Schattenseite des Verfahrens liegt darin, daß, wie Drechsel[1]) und Praetorius[2]) übereinstimmend angeben, die erhaltene reine Cyanamidlösung beim Eindampfen aus unübersehbaren Gründen nicht selten überwiegend oder fast ausschließlich das Polymerisationsprodukt liefert. Aus diesem Grunde hat der Vorschlag von Walter[3]), die Entschwefelung in alkalischer Lösung mit Bleiacetat auszuführen, keinen Wert, da die Isolierung durch das in der Lösung vorhandene Kaliumacetat ohne sonstigen Vorteil entschieden erschwert wird. Ein weiterer Nachteil der Vollhardschen Methode liegt, wie Pelizzari[4]) erkannt hat, in der bedeutenden Flüchtigkeit des Cyanamids mit Wasserdämpfen, die bei dem Eindampfen der Lösung zu anschnlichen Verlusten führt. Wenn trotzdem die Vollhardsche Methode der Methode von Cloez und Canizzaro bei weitem vorgezogen wurde, so lag dies nur an der großen Schwierigkeit und Unannehmlichkeit, die die Bereitung und das Arbeiten mit dem Chlor- oder Bromcyan bedingte. Da es aber gar keine Schwierigkeiten macht, sich rasch und in jeder beliebigen Menge eine ätherische Bromcyanlösung zu bereiten, indem man das bekannte Schollsche Verfahren, Zutropfen einer konzentrierten Cyankaliumlösung zu Brom, dadurch modifiziert, daß man mit einer verdünnten Lösung arbeitet und das Bromcyan ausäthert[5]), verlangt das ursprüngliche Darstellungsverfahren von Cloez und Canizzaro sicher wieder erhöhte Berücksichtigung. Wie schon Drechsel[6]) beobachtet hat und durch Beobachtungen von Kaess und Gruszewicz[7]) bei der Umsetzung von Chlorcyan mit Methylamin sich bestätigt, entsteht bei dieser Reaktion in geringer Menge auch Guanidinsalz, das sich mit dem Ammoniumsalz abscheidet.

Nach Praetorius-Seidler[8]) vermag Cyanamid unter Übergang in Harnstoff wasserentziehend zu wirken; beim Erhitzen mit Ameisensäure zerfällt diese in CO und H_2O; Milchsäure geht in das Anhydrid über, eine alkoholische Salicylsäurelösung bildet beim Erhitzen mit Cyanamid, das dabei in Harnstoff übergeht, Salicylsäureester. Mit starken organischen Säuren entstehen die entsprechenden Harnstoffsalze, die zum Teil unter weiterer Wasserentziehung in Acidylharnstoffe übergehen können[9]).

Abgesehen von noch einigen speziellen Bildungsweisen des Cyanamids bei gewissen Spaltungsreaktionen[10]), stehen aber heute

[1]) J. pr. Ch. [2] 11, 298.
[2]) J. pr. Ch. [2] 21, 129.
[3]) J. pr. Ch. [2] 54, 510.
[4]) Gaz. chim. ital. 21, 332.
[5]) F. A. Baum, Ber. 41, 523.
[6]) J. pr. Ch. [2] 8, 328.
[7]) Ber. 35, 3598.
[8]) J. pr. Ch. [2] 21, 129.
[9]) F. Baum, Ber. 41, 525.
[10]) Vgl. Tiele, Ann. 273, 136. — Freund und Schander, Ber. 29, 2500. — Fromm, Ber. 42, 3804.

für die Gewinnung des Cyanamids sowohl im Cyanamidnatrium als im Kalkstickstoff fertig gebildete, wohlfeile Cyanamidverbindungen zur Verfügung, bei denen man behufs Gewinnung des Cyanamids eigentlich nur auf seine Isolierung[1]) angewiesen ist. Trotz dieses einfachen Prozesses ist Cyanamid noch nicht im Handel zu haben. Das Cyanamidnatrium, $Na_2N.CN$, das nach der Gleichung $NH_2Na + NaCN = H_2 + Na_2NCN$ beim Erhitzen auf etwa 400° aus Natriumamid gewonnen wird[2]), erscheint weniger geeignet. In einer Patentschrift[3]) wird ein Verfahren zur Isolierung des Cyanamids daraus beschrieben, das darin besteht, die konzentrierte wässerige Natriumcyanamidlösung mit starker Schwefelsäure unter Vermeidung stärkerer Erhitzung derart zu neutralisieren, daß die gesamte angewandte Wassermenge gerade zur Bildung von $Na_2SO_4 . 10\,aq.$ ausreicht. Der entstehende harte Kuchen aus Glaubersalz wird zerkleinert und mit Alkohol, weniger gut mit Äther, systematisch ausgezogen; man erhält bis 70% des vorhandenen Cyanamids. Einen günstigen Erfolg gab eine Nachprüfung nicht. Viel leichter rein zu erhalten war das Cyanamid aus Kalkstickstoff. Die Isolierung aus demselben ist bisher noch nicht beschrieben, wohl aber die Gewinnung von Dicyandiamid durch Auskochen mit Wasser[4]).

Um eine solche, durch alkalische Reaktion bedingte Polymerisation, aber auch die durch Säure mögliche Verseifung zu Harnstoff zu vermeiden, wurde zuerst eine Zersetzung des Kalkstickstoffs bei ganz neutraler Reaktion in der Art versucht, daß derselbe in eine konzentrierte Lösung von Aluminiumsulfat eingetragen wurde. Nach der Gleichung

$$3\,CaN.CN + Al_2(SO_4)_3 + 6\,H_2O = 3\,NH_2.CN + 3\,CaSO_4 + Al_2(OH)_6$$

sollte die Lösung unter Bildung von Cyanamid und unlöslichem Aluminiumhydroxyd ganz neutral bleiben.

---

[1]) Abscheidung als Silbersalz und Zerlegung desselben mittels HCl: Drechsel, J. pr. Chr. 21, 77; als carbaminsaures Calcium und Zerlegung des letzteren durch Erhitzen in $CaCO_3$ und Cyanamid: ebenda 79.

[2]) D.R.P. 124977; C. 2, 1100, 1901.

[3]) D.R.P. 164724; C. 2, 1650, 1902; vgl. auch E. Fischer und Tüllner, Ber. 35, 2564.

[4]) Vgl. Söll und Stutzer, Ber. 42, 4532.

Es bildete sich bald ein dicker Brei, in dem sich der Kalkstickstoff nur schwierig vollständig umsetzte. Sobald die Reaktion alkalisch zu werden anfing, wurde frisches Aluminiumsulfat oder verdünnte Schwefelsäure, die solches regenierte, zugegeben, der Niederschlag abgesaugt und wiederholt nach Verrühren mit Wasser aufs neue abgesaugt; das Absaugen ging ziemlich schlecht von statten. Das neutralisierte Filtrat wurde im Vakuum eingedampft und gab leicht reines Cyanamid. Es zeigte sich dann, daß ohne Schaden durch etwaige Polymerisation der Kalkstickstoff mit kaltem Wasser ausgelaugt, und das Filtrat mit Aluminiumsulfat umgesetzt werden kann. Dies hat außerdem den großen Vorteil, daß die ganze Menge des gebildeten Kalks und der Kohle als sehr leicht abzusaugender und auswaschbarer Rückstand zurückbleibt. Da sich ferner zeigte, daß das Eindampfen im Vakuum ohne besondere Kautelen, insbesondere auch in verdünnterer Ausgangslösung erfolgen kann, und bei der weitgehenden Beständigkeit des wässerigen Cyanamidcalciumauszugs ein besonderes Einhalten möglichst neutraler Reaktion nicht erforderlich ist, ergab sich schließlich die ganz einfache Arbeitsmethode, daß der wässerige Calciumcyanamidauszug mit Schwefelsäure neutralisiert, vom ausgeschiedenen Gips abfiltriert und im Vakuum das Lösungsmittel abdestilliert wurde. Der Rückstand erstarrt in der Regel sofort beim Abkühlen unter der Wasserleitung.

75 g Kalkstickstoff wurden mit 400 ccm Wasser $^1/_2$ Stunde kräftig verrührt, abgesaugt, etwas gewaschen, und zum zweitenmal mit etwa 400 ccm Wasser ebensolange verrührt; das zweite Filtrat wurde zum Ausziehen einer neuen Portion Kalkstickstoff von 75 g verwendet, der dritte, in kürzerer Zeit bereitete Auszug der ersten Partie zum zweiten Ausziehen der zweiten Partie, und dann zum ersten Ausziehen einer dritten Partie verwendet. Schließlich wurde die erste Partie noch kurz zum viertenmal mit Wasser erschöpft, und damit systematisch die folgenden Partien ausgezogen, so daß es schließlich noch zum ersten Ausziehen einer frischen vierten Partie diente; die so systematisch fortgesetzte Auslaugung jeder Partie mit 4maligem Wasserwechsel lieferte eine möglichst gesättigte Calciumcyanamidlösung, die mit Schwefelsäure neutralisiert wurde. Nach dem Absaugen des abgeschiedenen Gipses wurde im Vakuum flott eingedampft;

die später noch sich abscheidenden Gipsmengen mußten, falls das Stoßen zu heftig war, abgesaugt werden, bevor der letzte Rest verdampft werden konnte. Durch Anwendung eines geräumigen Kolbens mit langem Hals und Destillieraufsatz, sowie einer genügend weiten Luftcapillare konnte eine Unterbrechung auch vermieden werden.

Der beim Abkühlen erstarrende Rückstand wurde durch Aufnehmen in Äther von Gips und vorhandenen Dicyandiamid, eventuellen anderen Produkten, die sich je nach der Qualität des Kalkstickstoffs vorfinden, befreit, und durch Abdestillieren des Äthers reines Cyanamid erhalten.

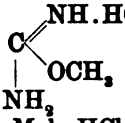
Wie schon Drechsel[1]) beobachtete, ist aber Löslichkeit in Äther noch kein Zeichen für Reinheit, vielmehr ist ein flockiger, amorpher Körper dem Cyanamid beigemengt, der sich in konzentrierter, ätherischer Lösung löst, und beim Verdünnen mit Äther ausfällt. Ein auf diese Weise von dem Nebenprodukt befreites Präparat konnte im Vakuum bei etwa 18 mm und 143 bis 144° unzersetzt destilliert werden, trotzdem nach den bisherigen Erfahrungen sich das Cyanamid bei etwa 150° unter Bildung von Dicyandiamid polymerisiert.

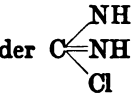
Aus dieser Beobachtung ergibt sich für das Cyanamid bei gewöhnlichem Druck, falls es unter dieser Bedingung unzersetzt destillierbar wäre, ein Siedepunkt von etwa 255 bis 260°. Diese Temperatur gestattet zwar noch eine vielleicht beträchtliche Flüchtigkeit mit Wasserdämpfen unter gewöhnlichem Druck, schließt aber eine Flüchtigkeit mit Wasserdämpfen bei niedrigem Druck und Temperatur nahezu aus, wie es besondere Prüfungen bei den angeführten Destillationen bestätigten.

Die Ausbeute an Cyanamid aus Kalkstickstoff bei der angegebenen einfachen Arbeitsweise ist, wenn man das Auslaugen systematisch gründlich ausführt und die Verteilung des Gesamtstickstoffs zwischen löslichem und unlöslichem Anteil kontrolliert, fast quantitativ; ein Verlust durch Polymerisation tritt fast gar nicht ein, sondern die Bildung an Dicyandiamid und anderen Nebenprodukten hängt nur von der von vornherein gegebenen Beschaffenheit des Kalkstickstoffs ab.

---

[1]) J. pr. Ch. [2] 11, 300.

Aus dem Cyanamid wurde nach Stieglitz und Mac Kee[1]) der Isoharnstoffäther  durch Addition von 1 Mol. Methylalkohol und 1 Mol. HCl bereitet.

Es wurde Cyanamid in etwa der doppelten der erforderlichen Menge trockenen Methylalkohols gelöst und HCl-Gas bis zur berechneten Gewichtszunahme eingeleitet. Trägt man nicht für hinreichende Kühlung Sorge, so tritt alsbald eine sehr nachteilige Erwärmung ein. Kühlt man genügend, so scheidet sich nach einiger Zeit, noch lange bevor alle Salzsäure eingeleitet ist, salzsaures Cyanamid, $CN.NH_2.2HCl$ oder  ab. Es ist nun sehr wichtig zur Erzielung einer guten Ausbeute, die gekühlte und erstarrte Masse dieses Salzes auch weiter dauernd zu kühlen, da sich das Salz sonst bald durch die allmählich verlaufende Umsetzung mit Alkohol spontan sehr heftig erhitzen kann. Vermeidet man jede solche stärkere Erwärmung, so ist nach einigen Stunden die Umwandlung in den Äther quantitativ erfolgt.

Der salzsaure Isoharnstoffäther ist in Alkohol viel leichter löslich als das salzsaure Cyanamid; dieses krystallisiert leicht aus, aus der mäßig eingeengten Mutterlauge kann dann das Isoharnstoffätherhydrochlorid mit Äther gefällt werden. Es darf mit $AgNO_3$ keine Cyanamidreaktion mehr geben. Eine alkoholische Lösung, die diese noch zeigt, verliert sie bei längerem Stehen bei Zimmertemperatur.

Zum Schluß sei noch bemerkt, daß nach dem Ergebnis der Vakuumdestillation die in der Literatur angeführten Fälle von Explosionen[2]) des Cyanamids im Vakuumexsiccator wohl als Irrtum zu bezeichnen sind, diese wurden mit größter Wahrscheinlichkeit dadurch hervorgerufen, daß das Cyanamid (ätherfeucht beim Absaugen sehr leicht herumspritzend) in die konz. H_2SO_4 fiel, wobei, wie schon Baumann[3]) berichtet, heftiges Aufzischen und kräftige Zersetzung stattfindet.

[1]) Ber. 32, 1494; 33, 807, 1517.
[2]) Walther, J. pr. Ch. [2] 54, 514.
[3]) Ber. 6, 1374.

Über die immunisatorische Anreicherung von Entwicklung anregenden Serumsubstanzen.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der zoologischen Station in Neapel.)

(Eingegangen am 6. Juni 1910.)

J. Loeb hat gezeigt, daß die Entwicklungserregung bei Seeigeleiern, die als Membranbildung in die Erscheinung tritt, durch eine große Anzahl von Substanzen bewirkt werden kann. Nach Loebs Anschauung stellt diese Membranbildung den ersten Schritt einer Cytolyse dar und wird daher durch alle Stoffe hervorgerufen, die in größerer Quantität auf die Eier lytisch wirken. Zu den Substanzen, welche die Entwicklung des Seeigeleies anregen, gehört nach Loeb auch tierisches Serum, insbesondere auch Säugetier-Serum. Ich habe untersucht, ob man immunisatorisch im Serum diese die Entwicklung anregenden Stoffe anreichern kann.

Kaninchen wurden mit Eiern resp. mit Sperma von Arbacia pustulosa vorbehandelt, indem ihnen frisches, unverändertes Material intraperitoneal eingespritzt wurde. Die Prüfung auf Wirksamkeit geschah mit einer Technik, die sich nach Möglichkeit an die klaren Angaben Loebs anschloß.

Auf folgende Punkte ist zu achten:

1. Wie Loeb beobachtet hat und ich bestätigen kann, wirkt das Serum ein und desselben Tieres auf die Eier verschiedener Exemplare derselben Seeigelspecies verschieden stark. Man muß also, wenn man mehrere Sera quantitativ vergleichen will, sie auf die Eier desselben Individuums einwirken lassen.

2. Einflüsse der Salzkonzentration müssen vollkommen ausgeschaltet sein. Ich habe daher immer 1 ccm Serum oder Bruchteile davon mit 5 ccm Meerwasser verdünnt und außerdem in Kontrollen das Serum durch 0,9%ige Kochsalzlösung ersetzt.

Alles weitere ergibt sich aus den Protokollen.

Untersuchte Kaninchensera.

I. Großes Kaninchen erhält 2 ccm Eier intraperitoneal am 28. III., 14. IV., 22. IV. — getötet am 29. IV.	derselbe Wurf
II. Großes Kaninchen, getötet am 29. IV. — Normalserum	

III. Kleines Kaninchen erhält 2 ccm Eier intraperitoneal am 14. IV., 22. IV. — getötet am 2. V.
IV. Kleines Kaninchen erhält 2 ccm Sperma intraperitoneal am 14. IV., 22. IV. — getötet am 2. V.
} derselbe Wurf

V. Kleines Kaninchen, getötet am 2. V. — Normalserum
VI. Mittelgroßes Kaninchen, getötet am 5. V. — Normalserum.

Versuch: In eine Reihe von Schalen kommen je 5 ccm Meerwasser, dazu

in A	1 ccm Serum I	dazu je ein Tropfen Arbacia-Eier
„ B	0,5 „ „ I + 0,5 ccm NaCl-Lös. (0,9%)	
„ C	0,1 „ „ I + 0,9 „ „ „	
„ D	1 ccm Serum II	
„ E	0,5 „ „ II + 0,5 „ „ „	
„ F	0,1 „ „ II + 0,9 „ „ „	
„ G	1 ccm Serum I	dazu je ein Tropfen Strongylocentrotus-Eier.
„ H	0,1 „ „ I + 0,9 „ „ „	
„ J	1 ccm Serum II	
„ K	0,1 „ „ II + 0,9 „ „ „	

Nach $1^1/_2$—$2^1/_2$ Stunden werden von allen Schalen Präparate angefertigt und eine beliebige Zahl von Eiern gezählt und ermittelt, bei wie vielen eine deutliche Membran ausgebildet ist.

	Mit Membran	Ohne Membran		Mit Membran	Ohne Membran
A	30	33	F	0	26
B	3	27	G	0	82
C	0	30	H	0	40
D	9	46	J	0	52
E	0	29	K	0	52

Ohne Serum bildete von 33 Arbaciaeiern und 40 Strongylocentrotuseiern kein einziges eine Membran.

Versuch: Dieselbe Anordnung, Eier von anderen Exemplaren — Untersuchung nach 4 Stunden.

	Mit Membran	Ohne Membran		Mit Membran	Ohne Membran
A	29	51[1])	F	0	23
B	5	42[1])	G	4	38[2])
C	0	37	H	nicht	untersucht
D	0	78	J	1	29[2])
E	0	45	K	nicht	untersucht

[1]) Hier zeigen auch die Eier ohne fertige Membran schon Ansätze zur Membranbildung.

[2]) Vereinzelte Eier mit cytolytischer Tropfenbildung.

Ohne Serum bildete von 47 Arbaciaeiern und 44 Strongylocentrotuseiern kein einziges eine Membran.

Versuch: Eier von einem anderen Exemplar von Arbacia — Untersuchung nach 10 Stunden.

	Mit Membran	Ohne Membran
Serum I 1 ccm	78	2
Serum II 1 ccm	0	78

Versuch: Zwei Parallelversuche mit Eiern von zwei verschiedenen Exemplaren von Arbacia — Untersuchung nach $6^1/_2$ Stunden. — Immer 1 ccm Serum

Serum	Versuch A		Versuch B	
	mit Membran	ohne Membran	mit Membran	ohne Membran
I	50	0	70[1])	0
III	12[2])	38	0	50
IV	12[2])	38	0	50
VI	14[2])	36	3[2])	47

Ohne Serum wurden je 50 Eier ohne Membran gezählt.

In einem anderen Versuche bildeten bei Strongylocentrotus I, III, IV und VI keine Membranen.

Ein Kommentar zu den Protokollen ist unnötig. Die Ausnahmestellung von Serum I, das von dem am längsten mit Arbaciaeiern vorbehandelten Kaninchen stammt, ist ohne weiteres ersichtlich.

Eine Abtötung von Spermatozoen konnte ich mit keinem der untersuchten Sera erzielen, wohl aber kam es bei Serum I, III und IV, also bei denen, die von vorbehandelten Tieren stammten, zu einer Haufenbildung, Erscheinungen, die wohl mit Beobachtungen v. Dungerns[3]) an Spermatozoen übereinstimmen.

Als Hauptergebnis der Untersuchung hat sich also ergeben, daß das Serum des Kaninchens durch immunisatorische Vorbehandlung der Tiere eine beträchtliche Steigerung seiner die Entwicklung anregenden Fähigkeit erlangt.

[1]) Bei einem Ei war die erste Furchung eingetreten.

[2]) Hier sind die Membranen nicht so gut ausgebildet wie beim Serum I.

[3]) Zeitschr. f. allgem. Physiol. 1, 1901.

Über das Verhalten der Sperma- und Eienzyme bei der Befruchtung und ersten Entwicklung.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der zoologischen Station in Neapel.)

(Eingegangen am 6. Juni 1910.)

Die Untersuchungen J. Loebs haben die chemische Analyse des Befruchtungsvorganges und der sich an die Befruchtung anschließenden ersten Entwicklungsprozesse angebahnt. Seine Vorstellungen haben in den exakten Studien O. Warburgs über die Oxydationsprozesse bei der Befruchtung und der Entwicklung weitgehende Bestätigung gefunden. Selbstverständlich hat man von jeher damit gerechnet, daß auch bei diesen Stoffwechselprozessen Enzymwirkungen maßgebend beteiligt sind. Speziell über das Verhalten der Katalase bei der Befruchtung sind mehrere Arbeiten veröffentlicht worden.

Mir lag daran, Enzyme des unbefruchteten Eies und der Spermatozoen kennen zu lernen, die mit Sicherheit den Zellen selbst zukommen und nicht etwa nur der die Zellen umspülenden Flüssigkeit angehören und zu prüfen, ob Ei und Sperma verschiedene Fermente besitzen. Dann sollte weiter ermittelt werden, ob der Enzymgehalt der Eizelle in bezug auf ihr eigentümliche Fermente bei der Befruchtung eine Änderung erfährt, ob außerdem nach der Befruchtung Fermentwirkungen auftreten, die der Zelle vorher fehlten.

Es bedarf keiner Erörterung, daß derartige Feststellungen für die Erkenntnis der biologischen Struktur notwendig sind, wenn auch ebenso klar ist, daß eine unmittelbare Wertung solcher Daten verfrüht wäre.

Es wurde dann noch auf einem anderen Wege versucht, einen Einblick in die Entstehungs- und die Funktionsbedingungen der Enzyme zu erlangen. Bekanntlich hat C. Herbst in eingehenden Studien die Bedeutung der einzelnen Bestandteile des Meerwassers für die Befruchtung und Entwicklung des Seeigel-Eies erforscht. Aus seinen und J. Loebs Beobachtungen ergab sich namentlich, daß eine Reihe von Ionen für die normale Entwicklung unentbehrlich sind. Fehlen sie, so entwickeln sich die Eier entweder überhaupt nicht zu Larven, oder es entstehen an Stelle normaler Gebilde morphologisch mehr oder weniger gut charakterisierte Mißbildungen. Da doch ohne Zweifel in weitem, wenn auch noch unbekanntem Maße die morphologische Gestaltung mit dem chemischen Aufbau des Protoplasmas zusammenhängt, so war zu prüfen, ob den morphologischen Abweichungen auch chemische parallel gehen. Auch für diesen Punkt schienen die Enzyme geeignete Objekte, zumal auch sonst bekannt ist, daß die Fermente in weitem Umfange von der Zusammensetzung des Milieus abhängig sind.

Läßt man Spermatozoen oder Eier des Seeigels, Arbacia pustulosa, nachdem man die Zellen durch Chloroform abgetötet hat, bei alkalischer oder neutraler Reaktion auf Gelatine einwirken, so erhält man häufig durch mehr oder minder große Dosen Verflüssigung der Gelatine. Jedoch ist das weder beim Sperma noch bei den Eiern ein konstanter Befund.

Bei zwei konstanten Reaktionen war es möglich, ein verschiedenes Verhalten von Sperma und Eiern festzustellen: Einmal bei der Spaltung der Gelatine bei saurer Reaktion, sodann bei der Spaltung eines Peptids, des Glycyltryptophans.

Gelatinespaltung.

Versuchsbeispiele:

1. Sperma resp. Eier werden direkt aus der Geschlechtsöffnung entleert (Arbacia pustulosa), dann im Meßzylinder mit Meerwasser auf das 5fache verdünnt und mit einigen Tropfen Chloroform durchgeschüttelt.

Von diesem Material kommt in jede Probe je 1 ccm, von der Gelatine (5%) je 2 ccm; die Röhrchen, in denen weniger Säure resp. Soda sich befindet, werden mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Nach der Mischung kommen die Proben eine Stunde in den Brutschrank bei 34 bis 35°, dann verbleiben sie 24 Stunden bei Zimmertemperatur.

Es wird immer 5%ige mit Chloroform versetzte Gelatine benutzt.

	Sperma 1 ccm ($^1/_5$)	Eier 1 ccm ($^1/_5$)
Soda 1%	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ weich	0,1 „ weich
	0,2 „ „	0,2 „ „
	0,3 „ „	0,3 „ „
	0,4 „ „	0,4 „ fast flüssig
	0,5 „ „	0,5 „ „ „

Zwei Proben, bei denen anstatt Sperma oder Eiern je 1 ccm Meerwasser zugesetzt wird, bleiben fest (Soda 0,5).

$^n/_{10}$-Salzsäure	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ „
	0,2 „ „	0,2 „ „
	0,3 „ „	0,3 „ fast flüssig
	0,4 „ „	0,4 „ flüssig
	0,5 „ „	0,5 „ „

Kontrollen: HCl 0,5 — Meerwasser 1 ccm fest.

2. Die gleiche Anordnung. Bei den Proben, bei denen nur 0,5 resp. 0,1 des Materials benutzt wird, wird die Differenz mit Meerwasser aufgefüllt.

	Sperma 1 ccm ($^1/_5$)	Eier 1 ccm ($^1/_5$)
Soda	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ fast flüssig
	0,3 „ flüssig	0,3 „ „ „
	0,5 „ fast flüssig	0,5 „ flüssig
	Kontrollen: fest.	
HCl	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ weich
	0,3 „ „	0,3 „ sehr weich
	0,5 „ „	0,5 „ flüssig
	Kontrollen: fest.	

	Sperma 0,5 ccm ($^1/_5$)	Eier 0,5 ccm ($^1/_5$)
Soda	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ weich	0,1 „ weich
	0,3 „ „	0,3 „ fast flüssig
	0,5 „ fast flüssig	0,5 „ „ „
	Kontrollen: fest.	
HCl	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ „
	0,3 „ „	0,3 „ „
	0,5 „ „	0,5 „ sehr weich
	Kontrollen: fest.	
	Sperma 0,1 ($^1/_5$)	
Soda	0 ccm fest	
	0,1 „ „	
	0,3 „ „	
	0,5 „ weich	
	Kontrolle: fest.	
HCl	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ „
	0,3 „ „	0,3 „ „
	0,5 „ „	0,5 „ „
	Kontrolle: fest.	

3. Die gleiche Anordnung — alle Kontrollen fest.

	Sperma 1 ccm ($^1/_5$)	Eier 1 ccm ($^1/_5$)
Soda	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,5 „ flüssig	0,1 „ weich
		0,3 „ fast flüssig
		0,5 „ „ „
HCl	0,5 ccm fest	0 ccm fest
		0,1 „ „
		0,3 „ flüssig
		0,5 „ „
	Sperma 0,5 ccm ($^1/_5$)	Eier 0,5 ccm ($^1/_5$)
Soda	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ weich	0,1 „ „
	0,3 „ sehr weich	0,3 „ „
	0,5 „ fast flüssig	0,5 „ fast flüssig
HCl	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ flüssig
	0,3 „ „	0,3 „ fast flüssig
	0,5 „ „	0,5 „ „ „
	Sperma 0,1 ccm ($^1/_5$)	Eier 0,1 ccm ($^1/_5$)
Soda	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ „
	0,3 „ „	0,3 „ „
	0,5 „ „	0,5 „ „
HCl	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ „
	0,3 „ „	0,3 „ „
	0,5 „ „	0,5 „ weich

4. Ein Teil des Spermas und der Eier wird $^1/_2$ Stunde zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgegossen. — Vor und nach dem Zentrifugieren Verdünnung des Spermas 1:5, der Eier 2:15.

		Nicht zentrifugiert
	Sperma 1 ccm	Eier 1 ccm
Soda	0 ccm fest	0 ccm zum Teil flüssig
	0,1 „ weich	0,1 „ weich
	0,3 „ „	0,3 „ sehr weich
	0,5 „ sehr weich	0,5 „ weich
HCl	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ „
	0,3 „ „	0,3 „ fast flüssig
	0,5 „ „	0,5 „ flüssig
		Zentrifugiert
Soda	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ „
	0,3 „ „	0,3 „ „
	0,5 „ „	0,5 „ „
HCl	0 ccm fest	0 ccm fest
	0,1 „ „	0,1 „ fast fest
	0,3 „ „	0,3 „ weich
	0,5 „ „	0,5 „ flüssig

Die den Eiern eigentümliche Gelatinespaltung bei saurer Reaktion, die also durch Zentrifugieren nicht beeinträchtigt wird, bleibt den Eiern auch nach der Befruchtung erhalten.

1. Die von einem einzigen Seeigel (Arbacia pustulosa) durch Auslaichen gewonnenen Eier werden sorgfältig mit Meerwasser gewaschen, ein Teil dann mit Chloroform auf Eis aufbewahrt, ein Teil befruchtet.[1]) Nach der Befruchtung wird wieder mehrfach sorgfältig gewaschen, die Entwicklung $21^1/_2$ Stunden ausgedehnt. Zu dieser Zeit sind die Eier sehr gleichmäßig bis zum Vierzellenstadium entwickelt, noch in der Membran. Sie werden durch Absitzen und Zentrifugieren gesammelt. Zur Untersuchung werden sie 1:10 verdünnt.

Zu allen Proben wird 0,5 ccm $^n/_{10}$-HCl gesetzt, die Auffüllung erfolgt durch Meerwasser.

	Vor der Befruchtung	Nach der Befruchtung
Eier $^1/_5$	0 ccm fest	
	0,1 „ „	0,1 ccm fest
	0,3 „ dickflüssig	0,3 „ dickflüssig
	0,7 „ flüssig	0,7 „ flüssig
	1,0 „ „	1,0 „ „

2. Unterbrechung der Entwicklung nach 18 Stunden. — Gleichmäßige Entwicklung, Larven noch nicht ausgeschlüpft.

Verdünnung 1:10 — immer 0,5 HCl-Auffüllung mit Meerwasser.

Vor der Befruchtung	Nach der Befruchtung
0,1 ccm fest	0,1 fest
0,5 „ fast flüssig	0,5 fast flüssig
0,7 „ flüssig	0,7 flüssig
0,8 „ „	0,8 „
1,0 „ „	1,0 „

Das bei saurer Reaktion gelatinolytische Ferment bleibt auch wirksam, wenn die Entwicklung im kalkfreien Medium stattfindet. Es wurden zwar auch Versuche angestellt, bei denen die Befruchtung selbst im kalkfreien Seewasser vorgenommen wurde. Da hierbei jedoch keine gleichmäßige Entwicklung der Eier erzielt wurde, will ich mich darauf beschränken, zu konstatieren, daß nach normaler Befruchtung die Entwicklung im kalkfreien Medium an dem Fermentgehalt der Eier in bezug auf das geprüfte Enzym nichts ändert.

Kalkhaltiges und kalkfreies künstliches Seewasser wurde nach den Vorschriften von J. Loeb hergestellt. Es wurden $^n/_{10}$-normale Stammlösungen der betreffenden Salze bereitet. Von diesen Lösungen wurden gemischt:

100 ccm NaCl — 2,2 ccm KCl — 7,8 ccm $MgCl_2$ — 3,8 ccm $MgSO_4$. Hierzu kamen beim kalkhaltigem Seewasser 2 ccm $CaCl_2$.

Zu 1000 ccm künstlichem Seewasser wurden dann noch 5 ccm $^n/_2$-$NaHCO_3$ und 2 bis 3 ccm $^n/_{10}$-NaOH gefügt.

[1]) Um eine gleichmäßige Entwicklung zu erzielen, müssen die Eier vor und nach der Befruchtung sorgfältig gewaschen und nach der Befruchtung in dünner Schicht verteilt werden.

1. Das Waschen der unbefruchteten Eier, die Aufschwemmung des Spermas und die Befruchtung erfolgt in Seewasser, dem auf 1000 ccm 0,5 $^n/_{10}$-NaOH zugesetzt wird. $^1/_2$ Stunde nach Zufügung des Samens ist bei den meisten Eiern die Membranbildung beendet. Nunmehr wird bei der einen Abteilung das natürliche Seewasser durch kalkhaltiges, künstliches, bei der anderen durch kalkfreies, künstliches Seewasser ersetzt. Mit den betreffenden Lösungen wird mehrfach gewaschen. Nach 22 Stunden sind in beiden Portionen die meisten Eier zu Larven entwickelt. Es wird zentrifugiert. Schließlich werden beide Portionen im Verhältnis 1:5 mit natürlichem Meerwasser aufgefüllt und mit Chloroform versetzt.

a) kalkhaltig	b) kalkfrei
0 ccm fest	
0,1 „ „	0,1 ccm fest
0,3 „ „	0,3 „ „
0,5 „ weich	0,5 „ weich
0,8 „ fast flüssig	0,8 „ fast flüssig
1,0 „ „ „	1,0 „ flüssig

2. Unterbrechung der Entwicklung nach 6 Stunden. — Die Fermentuntersuchung beider Portionen erfolgt in kalkfreiem Wasser.

a) Entwicklung im Kalkmedium	b) Entwicklung im kalkfreien Medium
0 ccm fest	
0,1 „ „	0,1 ccm fest
0,3 „ sehr weich	0,3 „ sehr weich
0,5 „ „ „	0,5 „ fast flüssig
0,8 „ „ „	0,8 „ „ „
1,0 „ flüssig	1,0 „ flüssig

Glycyltryptophanspaltung.

Auch diese Versuche wurden sämtlich mit Arbacia pustulosa ausgeführt. Schon kleine Mengen Sperma (0,1) spalten deutlich aus dem Peptid Tryptophan ab, während unbefruchtete Eier (0,1 bis 2 ccm) das nicht tun. Als Glycyltryptophan wurde das von Neubauer und Fischer angegebene und von Kalle & Co. gelieferte „Fermentdiagnostikon" benutzt, das durch Toluol konserviert wird. Nach der Befruchtung spalten auch die Eier das Peptid.

Entwicklungsdauer 21 Stunden. — Die meisten Eier schon zu schwimmenden Larven entwickelt. — 0,4 ccm der Eier, auf 2 ccm verdünnt, werden zu einem Fläschchen des Diagnostikums getan und verbleiben 60 Stunden bei 35° im Brutschrank.

Die Prüfung auf Tryptophan erfolgt dann so, daß eine geringe Menge verdünnter Salzsäure und Brom zugefügt wird. Endlich wird noch nach dem Vorschlag von Neuberg[1]) Essigester zugefügt.

---

[1]) Diese Zeitschr. 24, 441, 1910.

Bei den unbefruchteten Eiern geht in den Ester nur der orangefarbige Eierfarbstoff, bei den befruchteten färbt sich der Ester prachtvoll rosa.

0,02 ccm der Eier geben bei der unbefruchteten keine Spur einer Reaktion, bei der befruchteten eine deutliche Reaktion.

Derartige Resultate wurden mehrfach erhalten; in einem Falle, in dem die Entwicklung bereits beim Beginn der Furchung unterbrochen wurde, war die Bromreaktion bei den befruchteten Eiern nur schwach.

Somit war also erwiesen, daß schon früh im Laufe der Entwicklung ein Enzym auftritt, das den Eiern vor der Befruchtung fehlt. Obwohl nun das Sperma über dieses Ferment verfügt, wäre es doch verfehlt, ohne weiteres anzunehmen, daß das Ferment, das sich in den befruchteten Eiern findet, aus dem Sperma stammt. Zur Befruchtung genügt bekanntlich eine sehr geringe Spermamenge. Zudem wird bald nach der Befruchtung der Spermaüberschuß durch Waschen der Eier entfernt. Durch J. Loebs so vollkommen ausgebildete Methoden der künstlichen Parthenogenese bot sich aber auch der direkte Weg zur Entscheidung. Wenn das Sperma-Enzym notwendig ist, dann muß es bei den parthenogenetisch entwickelten Eiern fehlen, während es vorhanden sein muß, wenn sich das Enzym auf Grund der Entwicklungserregung aus Vorstufen bildet. Da das letztere tatsächlich der Fall ist, so dürfte der Enzymgehalt des Spermas mit dem Enzym im befruchteten Ei nichts direkt zu tun haben, vielmehr nur das Sperma durch seine die Entwicklung anregende Funktion die Zymogenese anregen. Diese Leistung der Spermatozoen wird eben dann bei der Parthenogenese durch chemische Einwirkungen einfacher Art ersetzt.

J. Loeb hat außerordentlich exakte Angaben über die Methodik der Parthenogenese gemacht. Da ich aber erst die Technik lernen mußte und für meine Versuche mehr Material brauchte, als notwendig ist, wenn man die Parthenogenese nur demonstrieren will, so verfüge ich nur über drei gelungene Versuche, die aber gleichmäßig stark positiv ausfielen.

Es wurden die sorgfältig gewaschenen Eier von Arbacia pustulosa für 2 Minuten in Meerwasser getan, dem auf 100 ccm 2,5 ccm $^n/_5$-Isovaleriansäure zugefügt war. Die Eier verblieben im ersten Versuch 15 Minuten, im zweiten und dritten Versuch 20 Minuten in gewöhnlichem Meerwasser, um dann für 20 und 30 Minuten in Meerwasser zu kommen, dem auf 50 ccm 8 ccm 15%ige Kochsalzlösung zugesetzt ist.

Beim ersten Versuch wurden schwimmende Larven erzielt, bei den beiden anderen die Entwicklung bis zum Vierzellenstadium fortgesetzt.

In allen drei Versuchen war die Tryptophanreaktion bei den unbefruchteten Eiern negativ, bei den befruchteten stark positiv.

Zusammenfassung.

1. Eier und Sperma besitzen den Zellen und nicht der Zwischenflüssigkeit angehörige Enzymwirkungen.

2. Das Sperma verfügt über Enzymwirkungen, die den unbefruchteten Eiern fehlen und umgekehrt.

3. Nach der Befruchtung bleibt ein dem Ei angehöriges Enzym unverändert wirksam, während ein dem Sperma eigentümliches im Ei auftritt.

4. Das nach der Befruchtung im Ei auftretende Enzym braucht trotz seines Vorkommens im Sperma nicht von einem Spermaenzym abgeleitet zu werden, da es auch bei der parthenogenetischen Entwicklung auftritt.

5. Entwicklung im kalkfreien Medium verändert den Enzymgehalt des Eies in der darauf untersuchten Richtung nicht.

Dem preußischen Kultusministerium danke ich ergebenst für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, den Herren von der zoologischen Station, insbesondere den Herren Dr. Dohrn und Henze, bin ich für die liebenswürdige Aufnahme zu größtem Danke verpflichtet.

Weitere Beiträge zur Chemie der Geschwülste.

VII. Mitteilung.

Von

C. Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität und der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

In einer Reihe früherer Mitteilungen habe ich mich mit der chemischen Zusammensetzung der Tumoren und mit den von ihnen ausgehenden enzymatischen Vorgängen beschäftigt. Hinsichtlich der letzteren hat sich dabei ergeben, daß in manchen Fällen unzweifelhaft atypische Fermentwirkungen nachweisbar sind und daß von diesen ein Teil ihrer Eigenschaft nach in das Gebiet der heterolytischen Erscheinungen gehört.

Bei diesen handelt es sich ganz allgemein um Beeinflussung des Organstoffwechsels durch Agenzien, die anderen Organen entstammen. Meine ersten Befunde dieser Art habe ich des öfteren ergänzt; auch Blumenthal hat sich der Auffassung dieser Vorgänge als heterolytischer angeschlossen, und kürzlich habe ich gemeinsam mit Blumenthal und Jacoby weitere Beobachtungen über Heterolyse von Geschwülsten mitgeteilt.[1])

Diesem Tatsachenmaterial gegenüber kann kein Zweifel an den abnormen Fermentprozessen bestimmter Carcinome bestehen.

Die gegenteiligen Angaben von Heß und Saxl befinden sich mit allen bisherigen Feststellungen über die Autolyse der Tumoren von Petry, Neuberg, Baer, Eppinger, Umber, v. Bergmann, Blumenthal, Jacoby und Wolff sowie mit den Befunden von M. Jacoby über die gewöhnliche Heterolyse in Widerspruch.

Die Ansicht Kepinows, daß heterolytische Wirkungen von Tumoren auf Fermente eingewanderter Bakterien bzw. Leukocyten zu beziehen seien, hat nichts Überzeugendes, und sie ist ohne weiteres für diejenigen meiner Versuche auszuschließen, wo solide aus der Tiefe der Leber herauspräparierte Metastasen zur Verwendung kamen.

Daß die von mir schon vor Jahren begründete Idee der atypischen Enzymvorgänge beim Krebs eine richtige und

[1]) Literatur siehe bei C. Neuberg, Chemie der Neubildungen in Oppenheimers Handbuch der Biochemie 2, II, 377, 1909.

glückliche gewesen ist, geht klar auch aus den Versuchen anderer Autoren hervor, die auf ganz abweichenden Wegen und mit neuer Methodik entsprechende Ergebnisse erzielten.[1])

Zuerst entdeckte H. Fischer bei Krebs das Vorkommen eines ungewöhnlichen proteolytischen Fermentes in carcinomatösem Magensaft, das zum Unterschiede vom Pepsin Eiweiß weit über die Albumosenstufe, bis zu freien Aminosäuren, aufspaltet. Dann fanden O. Neubauer und H. Fischer gleichfalls im Magensaft Krebskranker ein höchst wirksames peptolytisches Enzym. Dasselbe fehlt im Mageninhalt Gesunder und findet sich auch in den Geweben sowie Preßsäften von bösartigen Tumoren in ganz bedeutend gesteigerter Menge. Fischer und Neubauer haben dieses Enzym durch seine auch diagnostisch verwertbare Fähigkeit charakterisiert, das Dipeptid Glycyl-tryptophan zu hydrolysieren.

Eingehende Untersuchungen über ungewöhnliche Fermentäußerungen von Tumoren hat ferner E. Abderhalden, z. T. in Gemeinschaft mit P. Rona, A. H. Koelker, Fl. Medigreceanu und L. Pincussohn angestellt. An einem großen Material zeigten sie, daß häufig, aber nicht regelmäßig, in menschlichen und tierischen Geschwülsten Enzyme nachweisbar sind, die Polypeptide und Peptone viel schneller spalten, als es die normalen Zellfermente vermögen. Außerdem ergab sich, daß die Krebssäfte Polypeptide auch in durchaus atypischer Richtung zerlegen. Während z. B. normaliter das d-Alanyl-glycyl-glycin durch Zellfermente zu d-Alanin und Glycyl-glycin hydrolysiert wird, spaltet Tumorsaft zunächst in Glykokoll und d-Alanyl-glycin. Der Abbau bei Carcinom setzt also an ganz anderen Stellen der Aminosäurenverbände ein, als an denen, wo alle übrigen peptolytischen Fermente angreifen.

Die Ergebnisse von H. Fischer, O. Neubauer sowie von E. Abderhalden und seinen Mitarbeitern stehen in unverkennbarer Beziehung zu den Erscheinungen der verstärkten Autolyse und der Heterolyse der Tumoren.

---

[1]) Verwiesen sei auch auf die Antifermenterscheinungen bei Carcinom, namentlich auf die antitryptischen Wirkungen des Blutes, die von L. Brieger, H. Salomon, G. v. Bergmann u. a. studiert worden sind; ferner auf die Untersuchung von H. Salomon (cf. S. 348), der das Verdienst hat, als erster auf besondere peptolytische Enzyme im Serum Krebskranker gefahndet zu haben.

Ob die atypischen Fermentvorgänge beim Krebs während des Lebens zur Geltung kommen, ob sie eigentlich[1]) teil haben, wie man gemeint hat, an den Erscheinungen der Kachexie und ob sie überhaupt für den Verlauf und die Ausbreitung der Tumoren von Bedeutung sind, dafür fehlt der strikte Beweis.

Jeder Stoffaustausch zwischen den Zellen findet im wesentlichen durch den Blut- und Lymphstrom statt; beide sind auch die Vermittler der feinsten von Organ zu Organ geäußerten Fermentwirkungen.

Daraus erwächst die Aufgabe, zu untersuchen, was chemisch Nachweisbares erfolgt, wenn Tumor und Blut bzw. Geschwulst und Lymphe zusammentreffen.

Bei der Kompliziertheit der Vorgänge habe ich versucht, zunächst die Formelemente des Blutes auszuschalten, und berichte vorläufig über die Einwirkung von Blutserum auf Krebsmaterial.

Die Versuchsanordnung schließt sich im Prinzip an meine frühere an. Um Störungen durch anhaftendes Blut möglichst zu vermeiden, habe ich als Tumorsubstanz ausschließlich ganz große Lebermetastasen verwendet, die an sich blutarm sind und leicht auspräpariert werden können. Das Material wurde, um Blutreste entfernen zu können, nicht zerrieben, sondern zur möglichsten Schonung der Zellen unter wiederholter Befeuchtung mit zunächst toluolgesättigter 0,9%iger NaCl-Lösung mit der Hand ausgedrückt; das Preßgut wurde in etwa der 30fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und von Bindegewebsbeimengungen usw. mittels Kolieren durch Leinentuch befreit. Das Kolat wurde 3mal hintereinander schnell durch Zentrifugieren mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen. Das letzte, durch Abpipettieren entfernte Waschwasser war klar und farblos, der erhaltene lockere Zellenbrei schwach gelblich. Er ließ sich durch Aufschütteln in 0,9%iger NaCl-Lösung in einem Schüttelzylinder völlig gleichmäßig verteilen und wurde jedesmal frisch benutzt. Sera kamen in dreierlei Gestalt zur Anwendung: normales Menschenserum, Serum von an Carcinom Verstorbenen und Rinderserum, die in bekannter Weise gewonnen waren. Als Antisepticum wurde, da Chloroform wegen seiner Eiweiß fällenden Wirkung[2]) nicht in Betracht kam, Natrium-

[1]) Vgl. hierzu C. Neuberg, Virchows Archiv 192, 514, 1908.

[2]) E. Salkowski, Deutsche med. Wochenschr. 1888, Nr. 16.

fluorid benutzt, dessen Gehalt in allen Versuchen bis auf 0,75% gebracht wurde. Der Gleichmäßigkeit wegen wurden auch die Carcinomzellenaufschwemmungen mit 0,75% Natriumfluorid versetzt.

Als Maß stattgefundener Einwirkungen konnte einfach die Menge nicht koagulablen Stickstoffes dienen, die nach 48 Stunden einmal in der gemeinsam bei 38° digerierten Mischung von Serum plus Carcinomzellen, dann in den für sich bei 38° digerierten und erst unmittelbar vor der Verarbeitung vereinigten Portionen von Serum und Carcinomzellen gefunden wurden. Durch diese Versuchsanordnung ist man unabhängig von jeglichen im Blutserum und im Zellenbrei an sich eintretenden Veränderungen.

Die Bestimmung des nicht koagulablen Stickstoffes geschah in bekannter Weise.

Gemeinsam digerierte Mischungen zeigten schon äußerlich unverkennbare Differenzen. Innerhalb 48 Stunden war es in den normales Serum von Mensch oder Rind enthaltenden Proben zu einer weitgehenden, öfters fast völligen Auflösung der zugesetzten Carcinomzellen gekommen, bei den mit dem Serum Krebskranker digerierten Proben fanden sich dagegen die Carcinomzellen zusammengeklebt am Boden, meistens fast typisch agglutiniert; statt Zellauflösung war lediglich Agglutination erkennbar. Die Krebszellen waren aber innerhalb 48 Stunden niemals bei der Digestion für sich (so wenig wie in Berührung mit carcinomfremden Seris, in denen sie sich ja zu einer leicht getrübten Flüssigkeit auflösten), verklumpt.

A. 300 ccm Carcinomzellensuspension, die aus 250 g ursprünglichen Lebermetastasen hergestellt war.

I. Gemeinsame Digestion von:	Nicht koagulabler N entsprechend
1. 20,0 ccm Carcinomzellensuspension + 20,0 ccm Rinderblutserum	105,8 ccm $^n/_{100}$-H_2SO_4
2. 20,0 ccm Carcinomzellensuspension + 20,0 ccm norm. Menschenblutserum	117,4 „ „
3. 20,0 ccm Carcinomzellensuspension + 20,0 ccm Krebsblutserum	80,0 „ „
II. Getrennte Digestion und nachherige Mischung zur Analyse von:	
4. 20,0 ccm Carcinomzellensuspension; 20,0 ccm Rinderblutserum	97,1 „ „
5. 20,0 ccm Carcinomzellensuspension; 20,0 ccm norm. Menschenblutserum .	100,3 „ „
6. 20,0 ccm Carcinomzellensuspension; 20,0 ccm Krebsblutserum	79,6 „ „

B. 200 ccm Carcinomzellensuspension, die aus 200 g ursprünglichen Lebermetastasen gewonnen war.

I. Gemeinsame Digestion von:	Nicht koagulabler N entsprechend
7. 15,0 ccm Carcinomzellensuspension + 15,0 ccm Rinderblutserum	83,5 ccm $^n/_{100}$-H_2SO_4
8. 15,0 ccm Carcinomzellensuspension + 15,0 ccm norm. Menschenblutserum	73,1 „ „
9. 15,0 ccm Carcinomzellensuspension + 15,0 ccm Krebsblutserum	65,2 „ „
II. Getrennte Digestion und nachherige Vereinigung zur Analyse von:	
10. 15,0 ccm Carcinomzellensuspension; 15,0 ccm Rinderblutserum	73,4 „ „
11. 15,0 ccm Carcinomzellensuspension; 15,0 ccm norm. Menschenblutserum .	65,6 „ „
12. 15,0 ccm Carcinomzellensuspension; 15,0 ccm Krebsblutserum	64,9 „ „

C. Carcinomzellensuspension und Sera wie sub A.

I. Gemeinsame Digestion von:	Nicht koagulabler N entsprechend
13. 50,0 ccm Carcinomzellensuspension + 100,0 ccm Rinderblutserum	49,9 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4
14. 10,0 ccm Carcinomzellensuspension + 10,0 ccm Krebsblutserum	40,2 „ $^n/_{100}$-H_2SO_4
II. Getrennte Digestion und nachherige Mischung zur Analyse von:	
15. 50,0 ccm Carcinomzellensuspension; 100,0 ccm Rinderblutserum	43,3 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4
16. 10,0 ccm Carcinomzellensuspension; 10,0 ccm Krebsblutserum	40,0 „ $^n/_{100}$-H_2SO_4

Aus den angeführten Beispielen ergibt sich folgendes:

In den Fällen, wo Carcinomzellenbrei + normalem menschlichen oder tierischen Serum zusammen digeriert ist, befindet sich mehr nicht koagulabler Stickstoff in Lösung als bei getrennter Digestion; dagegen besteht kein deutlicher Unterschied zwischen den gemeinsamen und getrennten Digestionen von Krebszellen und Carcinomserum. Dieses Ergebnis steht im Einklange mit dem makroskopischen Befunde, daß normale Sera, aber nicht Krebsblutsera, Carcinomzellen in Lösung bringen.

In anderem Zusammenhange hat H. Salomon[1]) Versuche über die Einwirkung von Serum auf die Autolyse von Carcinomextrakten bzw. von Carcinompreßsäften angestellt. Wenn auch der Autor selbst auf

[1]) Wiener klin. Wochenschr. 57, 122, 1907.

die dabei erhaltenen Ergebnisse keinen besonderen Wert legen will (l. c.), so sei doch gegen die Versuchsanordnung namentlich ein prinzipielles Bedenken geltend gemacht. Salomon vergleicht die N-Zahlen, die nicht carcinomatöses Serum + Krebssaft und Carcinomserum + Krebssaft je zu Beginn und am Ende der Autolyse liefern. Nun ist keineswegs erwiesen, daß der Gehalt des Serums — und namentlich nicht der Sera unter allen möglichen, wenn auch carcinomfreien Zuständen, die Salomon benutzt hat — an autolytischen Fermenten konstant ist; vielmehr spricht alles dagegen. Darum sind die Sera in der angegebenen Richtung nicht miteinander direkt vergleichbar. Ein solcher Einwand besteht gegen meine oben beschriebene Versuchsanordnung nicht; hier wird der Einfluß des Serums durch getrennte und gemeinsame Digestion genau gleicher Materialien gemessen.

Zur Erklärung des Punktes, daß getrennte und gemeinsame Autolysen von Carcinomzellen und Krebsserum (im Gegensatz zur Verwendung von normalem artgleichen oder artfremden Serum) ziemlich gleiche Quantitäten nicht koagulablen Stickstoffs liefern, kann man eine ähnliche Annahme heranziehen, wie sie verschiedene Autoren für den erhöhten Gehalt des Carcinomserums an eigentlichem Antitrypsin gemacht haben. Man könnte sich nämlich vorstellen, ohne mit dieser Ausdrucksweise etwas präjudizieren zu wollen, daß gegen „Tumorenzyme", die ja beim Zerfall von Geschwulstmasse leicht in die Zirkulation geraten können, der krebskranke Organismus antiautolytische Fermente bildet. Diese Antikörper befinden sich dann im Blut, das sich so oft als der Sitz antiproteolytischer Kräfte gezeigt hat, und hindern hier die Auflösung von Carcinomzellen, so wie das normale Serum sonst tryptische Wirkungen normaler Organe oder deren Sekrete hemmt.

Es braucht zunächst nicht erörtert zu werden, ob es sich hier einfach um Erscheinungen der gewöhnlichen Autolyse handelt, oder ob Immunitätsreaktionen, wie die Cytolyse, mit im Spiele sind. Es sind ja auch seit H. Conradis[1]) Untersuchungen Beziehungen zwischen beiden Gebieten angebahnt. Die Frage nach einer die Autolyse hemmenden Wirkung des Blutes an sich kommt ebenfalls nicht in Betracht; denn sie müßte sich in gleicher Weise bei allen Seris geltend machen. Unter den obigen, ganz gleichartigen Versuchsbedingungen tritt sie nur bei dem Verhalten von Krebsserum gegen Krebszellen zutage. Außerdem haben L. Preti[2]) und A. v. Drjewezki[3]) unter E. Salkowskis Leitung gezeigt, daß normale Organe auch in Blut der Autodigestion unterliegen, während das Blut selbst

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 193, 1902.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 485, 1907.
[3]) Diese Zeitschr. 1, 229, 1906.

nach M. Oker-Blom[1]) nicht, nach L. Preti[2]) nur wenig autolysiert.[3])

Die bisherigen Versuche konnten ausschließlich mit Carcinommaterial von der Leiche ausgeführt werden, und es muß weiteren, viel zahlreicheren Untersuchungen an lebensfrischen Krebselementen vorbehalten bleiben, ein Urteil über die Bedeutung, Konstanz und Spezifität der Erscheinungen zu gewinnen. Dann wird man auch der Frage näher treten können, ob sich das Agglutinationsphänomen[4]) diagnostisch (zur Prüfung von krebsverdächtigem Serum mittels notorischer Krebszellen) verwerten läßt, ob prognostisch (nach Operationen) sich etwas über das Schicksal vielleicht vorhandener Metastasen (auf Grund der lösenden Kraft des Serums für Carcinomzellen) aussagen läßt. Auch für die biologische Deutung des Serumantitrypsins Carcinomatöser, dessen Existenz Brieger, Salomon und v. Bergmann festgestellt haben, und für die von A. Bier beobachtete lösende Wirkung artfremden Blutes auf Tumoren könnten sich neue Gesichtspunkte ergeben.

Die vorliegenden Versuche sind aus Mitteln bestritten, für deren Gewährung ich dem Deutschen Zentralkomitee für Krebsforschung auch an dieser Stelle bestens danke.

Ergänzung zu unserer Arbeit:

Beziehungen zwischen Trypsin und Erepsin.

Von

K. Glaeßner und A. Stauber.

Diese Zeitschr. 25, 204.

Durch ein Versehen ist der Befund von Frank und Schittenhelm[5]) über das Vorkommen des Erepsins in den menschlichen Faeces nicht in die Literaturangaben unserer Arbeit aufgenommen worden. Diese Autoren konnten sowohl durch Versuche mit Seidenpepton, als durch die Spaltbarkeit eines für Trypsin unangreifbaren Peptids den näheren Nachweis für das Vorkommen von Erepsin (neben Trypsin) in den Faeces erbringen.

---

[1]) Skandinav. Arch. 14, 48.

[2]) l. c.

[3]) Serum wohl noch weniger als Gesamtblut, da ihm die Enzyme der Formelemente, besonders der Leukocyten, fehlen (vgl. Ascoli und Moreschi, Lavori dell' XI. Congresso Medico, Roma 1902).

[4]) Siehe E. Freund und G. Kaminer, diese Zeitschr. 20, 312, 1910.

[5]) Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. des Stoffwechsels 1909, Nr. 23 und 1910, Nr. 2.

Die Abhängigkeit der Pflanzenatmung von den Lipoiden.

Von

W. Palladin und E. Stanewitsch.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der Universität in St. Petersburg.)

(*Eingegangen am 6. Mai 1910.*)

Mit 4 Figuren im Text.

Die Bezeichnung „Lipoide" wurde von Overton[1]) eingeführt. Nach der Formulierung Ivar Bangs[2]) sind „die Zellbestandteile, die durch Äther oder ähnliche Lösungsmittel extrahiert werden können, Lipoidstoffe".

Durch derartige Lösungsmittel werden außer Fetten und Fettsäuren die verschiedenartigsten Stoffe extrahiert. Hierher gehören erstens Cholesterin und Phosphatide. Letztere Bezeichnung ist von Thudichum[3]) eingeführt. Sie bezieht sich auf phosphorhaltige, in Äther und Alkohol lösliche organische Verbindungen. Die neuesten Untersuchungen haben erwiesen, daß Phosphor nicht die einzige in Lipoiden enthaltene Mineralsubstanz ist. So zeigte Glikin[4]), daß die Hälfte des Eisens in Frauen- und Kuhmilch in Lipoidform vorhanden ist. Das Eisen ist auch in den Blutlipoiden enthalten.[5]) Winterstein und Stegmann[6]) fanden in Ricinusblättern ein Lipoid mit bedeutendem (6,74%) Calciumgehalt. Stern und Thierfelder fanden Calcium im Phosphatid aus Eigelb. Einer von uns[7]) fand Calcium im Lipoid aus Weizenkeimen.

---

[1]) Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901.

[2]) Ivar Bang, Biochemie der Zellipoide (Asher und Spiro, Ergebn. d. Physiol. 6, I. u. II. 138, 1907).

[3]) Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. Tübingen 1901.

[4]) W. Glikin, diese Zeitschr. 21, 348, 1909.

[5]) W. Glikin, diese Zeitschr. 22, 461, 1909.

[6]) E. Winterstein und Stegmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 527, 1909.

[7]) W. Palladin, Noch nicht veröffentlichte Arbeit.

In Pflanzen sind Kohlenhydrate enthaltende Phosphatide sehr verbreitet.[1]) Daß wir es in diesem Falle nicht mit Adsorptionserscheinungen, sondern mit komplizierten chemischen Verbindungen zu tun haben, zeigen die Untersuchungen von Baskoff[2]). Er erhielt künstliche Verbindungen von Glucose und Spaltungsprodukten des Lecithins. C. Neuberg und H. Pollak[3]) haben andererseits festgestellt, daß sich in wässeriger Lösung von Rohrzucker bei Gegenwart von Chloroform, Phosphoroxychlorid und frisch geglühtem Ätzkalk ein Kalksalz des Monophosphorsäureesters des Rohrzuckers bildet. Zu den kohlenhydratführenden Phosphatiden der tierischen Organismen gehört außer Jecorin noch das Carnaubon[4]). F. Hoppe-Seyler[5]) nahm schon an, daß Lecithin mit Eiweiß eine Verbindung bilde. L. Liebermann[6]) schied aus dem Magen ein in Alkohol lösliches Lecithinalbumin aus, das beim Kochen mit Alkohol zerfällt und Lecithin liefert. Höchstwahrscheinlich kommen die Lipoide sowohl in Pflanzen als auch in Tieren hauptsächlich in Verbindung mit Eiweißstoffen vor. Durch Kochen mit Alkohol werden sie gespalten. Zugunsten dieser Ansicht sprechen die Versuche von Bondi und Eißler[7]). Sie erhielten Lipoproteide aus Verbindungen von Fettsäuren mit Aminosäuren. Diese Verbindungen sind in Alkohol löslich und werden von autolytischen Fermenten gespalten.[8]) Angesichts einer solchen Mannigfaltigkeit der chemischen Struktur der Lipoide einerseits und ihrer ausgesprochenen Fähigkeit zu Adsorptionserscheinungen andererseits ist es verständlich, daß wir noch keine ganz befriedigenden Methoden zur Trennung der Lipoide und Phosphatide besitzen.[9])

Dessenungeachtet sprechen die zahlreichen nunmehr vorhandenen Untersuchungen über Lipoide dafür, daß diesen Körpern eine hervorragende Bedeutung für das Leben der Zelle zukommt.[10]) So glaubt

---

[1]) O. Hiestand, Historische Entwicklung unserer Kenntnisse über die Phosphatide. Beiträge zur Kenntnis der pflanzlichen Phosphatide. Zürich 1906. — E. Winterstein und O. Hiestand, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 288, 1908. — E. Winterstein, l. c., 58, 500, 1909. — E. Winterstein und K. Smolenski, l. c., 58, 506, 1909. — K. Smolenski, l. c., 58, 522, 1909.

[2]) Baskoff, Zeitschr. f. physiol. Chem. 61, 426, 1909.

[3]) C. Neuberg und H. Pollak, diese Zeitschr. 23, 515, 1910.

[4]) E. K. Dunham und C. A. Jacobson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 302, 1910.

[5]) F. Hoppe-Seyler, Med. chem. Untersuchungen, 1867, Heft 2, 215.

[6]) L. Liebermann, Pflügers Archiv f. Physiol. 54, 573, 1893.

[7]) S. Bondi und F. Eißler, diese Zeitschr. 23, 499, 1910.

[8]) S. Bondi und F. Eißler, diese Zeitschr., l. c., S. 510.

[9]) E. Schulze und E. Winterstein, Phosphatide. Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 2, 256, 1909. Es liegen auch mikrochemische Untersuchungen über die Verteilung der Lipoide vor: C. Ciaccio. Centralbl. f. Pathol. 20, Heft 9, 1909.

[10]) Ivar Bang, Biochemie der Zellipoide II. (Ergebn. d. Physiol. 8, 463, 1909.)

Kossel[1]), daß jedes Protoplasma ausnahmslos immer Lecithin enthält. Die ausgedehnten Untersuchungen E. Schulzes[2]) und seiner Mitarbeiter, Stoklasas[3]) und anderer Forscher haben die weite Verbreitung der Phosphatide im Pflanzenreiche festgestellt. Außerdem zeigen viele Beobachtungen, daß die Hauptorgane reicher an Phosphatiden als die Nebenorgane sind. So fand Nerking[4]) in verschiedenen Organen des Kaninchens folgende Lecithinmengen: Rückenmark 35,18%, Gehirn 12,41%, Nieren 5,02%, Muskeln 2,59%, Blut 0,863%. In den Samen begleitet nach Stoklasa[5]) das Lecithin die Eiweißstoffe. Je mehr Eiweiß die Samen enthalten, desto reicher sind sie an Lecithin:

	Eiweiß	Lecithin	Fett
Lupinus luteus . .	38,25	1,59	4,38
Pisum sativum . .	23,13	1,23	1,89
Cannabis sativa .	18,23	0,88	32,58
Helianthus annuus	14,22	0,44	32,26
Zea mays	9,12	0,28	4,36

Junge und lebenskräftige Organe sind reicher an Phosphatiden als alte Organe. Maxwell[6]) fand z. B., daß die Keimung der Samen am Licht von einer Zunahme des Lecithins begleitet wird. In Samen von Phaseolus vulgaris waren 0,933 Lecithin enthalten; in jungen Keimlingen 1,841 und später 3,23. Nach Vageler[7]) fällt eine starke Zunahme der pflanzlichen Phosphatidenmenge mit der Blüte- und Fruchtanlagezeit zusammen. Nach Glikin[8]) sind im Knochenmark eines neugeborenen Hundes über 37% Lecithin enthalten; nach 5 Wochen — 18,6%, und nach 10 Wochen — 9,5%. Zugunsten der wichtigen Bedeutung der Phosphatide für das Leben der Zelle spricht jener Umstand, daß dieselben ebenso wie die Eiweißstoffe leicht zerfallen.

Beim Keimen der Samen im Dunkeln nimmt die Menge des Lecithins ab.[9])

---

[1]) A. Kossel, Chemische Zusammensetzung der Zelle. Chem. Centralbl. 2, 38, 1891.

[2]) E. Schulze und E. Steiger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 365, 1889. — E. Schulze und A. Likiernik, l. c., 15. — E. Schulze und Winterstein, l. c., 40, 101. — E. Schulze und S. Frankfurt. Landw. Versuchsstationen 43. — E. Schulze, l. c., 49, 203.

[3]) J. Stoklasa, Sitzungsber. d. Wien. Akad. Math.-Naturw. Kl. 104, Abt. I, 1896. Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 398, 1898.

[4]) Nerking, diese Zeitschr. 10, 193, 1908.

[5]) Zitiert nach Czapek, Biochemie d. Pflanzen 2, 158, 1905.

[6]) W. Maxwell, Chem. Centralbl. 2, 472, 1891.

[7]) H. Vageler, diese Zeitschr. 17, 189, 1909.

[8]) W. Glikin, diese Zeitschr. 4, 235, 1907.

[9]) E. Schulze und E. Steiger, l. c. — L. Iwanoff, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1902. — W. Zaleski, l. c., S. 426; 1907, 349.

E. Schulze und Winterstein[1]) glauben, daß der Zerfall des Lecithins durch ein besonderes Ferment hervorgerufen wird. Dafür spricht der Zerfall des Lecithins bei der Hefeautolyse.[2]) Nicht minder als Phosphatide sind auch andere phosphorfreien Lipoide verbreitet. Darunter sind die Cholesterine und Phytosterine[2]) besonders beachtenswert.

Die Lipoide sind fast an allen physiologischen Vorgängen beteiligt. In erster Linie ist ihr Verhältnis zu den fermentativen Prozessen bemerkenswert. Noch A. Schmidt[3]) hat gezeigt, daß die Lipoide (seine zymoplastischen Substanzen) die Blutgerinnung beschleunigen. Küttner[4]) fand, daß Lecithin je nach seiner Quantität bald stimulierend, bald hemmend auf die Fermentarbeit wirkt. Die Lipoide können auch als Gegengift funktionieren.

In diesem Sinne beeinflußt z. B. das Cholesterin die Saponine.[5]) Die Lipoide bilden einen Bestandteil der protoplasmatischen Hautschicht, obgleich ihre Bedeutung in letzterer Beziehung von Overton[6]) stark überschätzt worden ist, wie die Untersuchungen von Nathansohn[7]) und Ruhland[8]) erwiesen haben. Nach Ruhland „soll die Möglichkeit nicht bestritten werden, daß in gewissen Fällen die in der Zelle zweifellos weitverbreiteten fettartigen Körper das Eindringen mancher Verbindungen begünstigen bzw. hemmen könnten, aber es erscheint mir doch keinesfalls angängig, die diosmotischen Eigenschaften der lebendigen Zelle allgemein auf eine so einfache Formel, wie sie die Lipoidhypothese bildet, bringen zu wollen."[9]) Die regulatorische Tätigkeit der Hautschicht des lebenden Protoplasmas ist viel zu kompliziert, um durch die Lipoidhypothese allein erklärt werden zu können. Sehr eigentümliche Eigenschaften des Lecithins sind durch die Untersuchungen Werners[10]) bekannt geworden. Das der Einwirkung von Radium oder Röntgenstrahlen ausgesetzte Lecithin wird aktiviert und wirkt, wenn es eingespritzt wird, ebenso wie die erwähnten Strahlen. Die einzelnen Bestandteile des Lecithins lassen sich dagegen nicht aktivieren.

Schädliche Einwirkungen werden von einer Veränderung der Lipoidmenge im Organismus begleitet. So fand z. B. N. Sieber[11]), daß

---

[1]) E. Schulze und Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 40, 101, 1903.

[2]) Ivar Bang, l. c. — F. Röhmann, Biochemie. Berlin 1908. — Czapek, Biochemie der Pflanzen.

[3]) A. Schmidt, Zur Blutlehre. Leipzig 1892, S. 99 bis 105.

[4]) A. Küttner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 472, 1906 bis 1907.

[5]) A. Windaus, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 238, 1909.

[6]) Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901.

[7]) Nathansohn, Jahrb. f. wissensch. Bot. 39, 607, 1904.

[8]) Ruhland, Jahrb. f. wissensch. Bot. 46, 1, 1909.

[9]) Ruhland, l. c., S. 54.

[10]) Werner, Deutsche med. Wochenschr. 31.

[11]) N. Sieber, diese Zeitschr. 23, 262, 1909.

der Alkoholgenuß eine Abnahme der Phosphatide nach sich zieht. Bei Hunden wurde eine Abnahme hauptsächlich im Gehirn wahrgenommen (11%); die Magenwände zeigten dagegen ein Abnahme von nur 0,57%.

Nach den Versuchen von Stepp[1]) ist eine lipoidfreie Nahrung zur Erhaltung des Lebens ungeeignet. Er fütterte weiße Mäuse mit auf Milch gebackenem Weizenbrote, das getrocknet und mit 95%igem Alkohol und Äther extrahiert worden war. Sämtliche Versuchstiere kamen nach einigen Tagen um. Die Kontrolltiere dagegen, die dasselbe Brot mit Zugabe der extrahierten Stoffe erhielten, blieben am Leben. Der Tod der Mäuse war nicht eine Folge von Lecithinmangel, da nach Röhmann[2]) dieser Umstand ohne Bedeutung ist, sondern er wurde durch das Fehlen irgendwelcher anderweitiger Stoffe hervorgerufen. Es werden also die alten Versuche von B. Danilewsky[3]) bestätigt, der zuerst auf die wohltätige Einwirkung des Lecithins auf die Entwicklung von Kaulquappen, Hunden und Pflanzen hinwies. Die günstige Wirkung des Lecithins auf das Pflanzenwachstum wurde auch von Stoklasa[4]) festgestellt.

Alle angeführten Beispiele zeigen uns, daß nicht nur die Eiweißstoffe in der Zelle einer besonderen Beachtung von seiten der Physiologen wert sind. „In jeder Zelle existiert aber eine andere Kategorie von Körpern, die eben diese postulierte Labilität und Reaktionsfähigkeit besitzen, die sich nur mit dem Tode verändern, die unter sich aus sehr verschiedenartigen Substanzen bestehen und trotzdem intravital wahrscheinlich als biochemische Einheit vorkommen, die intim mit den Eiweißkörpern verbunden sind, die in vitro Eiweiß- und anderen Körpern neue Eigenschaften verleihen können, und die endlich einige der wichtigsten biologischen Eigenschaften der lebendigen Zelle darstellen. Diese Körper sind die Lipoidstoffe.“[5])

Es gab eine Periode in der Protoplasmaforschung, als man das Protoplasma aus Eiweißkörpern bestehend ansah. Die von Reinke[6]) ausgeführten Analysen der Plasmodien von Aethalium septicum zerstörten diese Ansicht. Im Protoplasma fand man Körper von der verschiedenartigsten chemischen Zu-

[1]) W. Stepp, diese Zeitschr. 22, 452, 1909.

[2]) F. Röhmann, Biochemie. Berlin 1908.

[3]) B. Danilewsky, Compt. rend. 123, 195, 1896.

[4]) J. Stoklasa, Sitzungsber. d. Wien. Akad., Math.-Naturw. Kl. 104, Abt. I, 1896.

[5]) Ivar Bang, Ergebn. d. Physiol., 6, 135, 1907.

[6]) J. Reinke und Rodewald, Studien über das Protoplasma. Berlin 1881.

sammensetzung. Ca. 50% der Substanz bestand aus Nichteiweißverbindungen.[1]) Das Protoplasma erschien als eine durch bestimmte Struktur ausgezeichnete Mischung von verschiedenen Verbindungen. Dieser Struktur wurde besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Deshalb wurden die Bezeichnungen „Protoplasma" und „Kern" im morphologischen Sinne gebraucht. Die Untersuchungen der letzten Jahre sprechen immer mehr gegen die Ansicht, daß das Protoplasma ein Gemenge von verschiedenen Stoffen sei. In der lebenden Zelle scheinen die das Protoplasma zusammensetzenden Verbindungen ein Ganzes zu bilden, obgleich viele Teile dieses Ganzen sehr lose aneinander gebunden sind. Von diesem Standpunkte ist die Bezeichnung „Protoplasma" auch als eine chemische aufzufassen. Das Protoplasma ist ein sehr großes und sehr labiles Molekül. Nach dem Tode zerfällt das Protoplasma in einzelne selbständige Stoffe, die öfters neue Verbindungen untereinander bilden. Gleichwie das Radiumatom in seine Bestandteile zerfällt, so zerfällt auch dieses große lebendige Atom in seine Elemente beim Abtöten des Protoplasmas.

Dank ihrer Fähigkeit, sich mit den verschiedenartigsten Stoffen zu verbinden,[2]) funktionieren die Lipoide sozusagen als ein Zement, der im lebenden Protoplasma die verschiedensten Stoffe zu einem Ganzen verbindet. Als Beispiel soll folgendes dienen: Schon Hoppe-Seyler[3]) vermutete, daß das Chlorophyll eine lecithinartige Substanz sei. Die Untersuchungen von Stoklasa[4]) zeigten, daß zwischen der Lecithin- und Chlorophyllmenge im Blatte ein inniger Zusammenhang besteht. Er behauptet deshalb, daß das Blattgrün eine Verbindung mit dem Lecithin vorstelle. Obgleich die genauen Untersuchungen von Will-

[1]) Vgl. auch die Analyse der Eiterzellen. O. Hertwig, Die Zelle und die Gewebe, 1893, S. 17.

[2]) „Seiner Formel nach müßte das Lecithin ein amphoterer Elektrolyt sein, d. h. gleichzeitig den Charakter einer Säure und Base haben. Dies scheint es ihm zu ermöglichen, sich mit seiner sauren oder basischen Gruppe an die entsprechenden Gruppen des Eiweißes anzulagern." F. Röhmann, Biochemie, 1908, S. 99.

[3]) F. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 340; 4, 193; 5, 75.

[4]) J. Stoklasa, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 29, 2761, 1896.

stätter[1]) gezeigt haben, daß das reine Chlorophyll keine Lecithinverbindung sei und von allen Aschenelementen nur Magnesium und keinen Phosphor enthält; dennoch spricht dieser Umstand keineswegs gegen die Ansicht, daß das Chlorophyll in der lebenden Zelle an Lecithin gebunden sei. Das Chlorophyll ist keine einfache Zumengung zum Protoplasma des Chlorophyllkorns, sondern es bildet mit demselben ein einheitliches Ganzes. Als Verbindungsglied (Zement) treten die Phosphatide auf.[2]) Durch Extraktion kann man diese Bindung zerstören und reines Chlorophyll gewinnen. Folgender Versuch spricht dafür, daß das Chlorophyll in den Pflanzen in gebundenem Zustande enthalten ist. Das Reinchlorophyll ist in Petroläther sehr leicht löslich. Dagegen werden aus trockenen Blättern von Mercurialis perennis nach 2wöchigem Stehen bei Zimmertemperatur nur minimale Spuren von Chlorophyll durch Petroläther extrahiert. Methylalkohol entzieht ihnen im Gegenteil sehr viel Chlorophyll. Es ist klar, daß der Petroläther die Verbindung des Chlorophylls mit dem Protoplasma nicht, Methylalkohol aber wohl zerstören kann. Ein weiteres Beispiel bietet folgender Fall. Das Lecithin ist sowohl in Äther als auch in Alkohol löslich. Aber aus pflanzlichen und tierischen Geweben extrahiert Alkohol viel mehr Lecithin als Äther. Das erklärt sich dadurch, daß ein bedeutender Teil des Lecithins an Eiweißstoffe gebunden ist und nur nach dem Gerinnen derselben unter dem Einfluß des Alkohols in Lösung übergeht.[3])

Die Atmung ist eine von den Hauptäußerungen des Zellenlebens. Unsere Aufgabe war es, die Abhängigkeit der Pflanzenatmung von den Lipoiden klarzulegen. Als Versuchsobjekte benutzten wir trockene Weizenkeime,[4]) die durch ihre große Atmungsenergie ausgezeichnet sind. Zur Kontrolle wurde die

[1]) R. Willstätter, Annal. d. Chem. 358, 267, 1908; Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 438, 1908.

[2]) Ich sage Phosphatide und nicht Lecithin, da es unbekannt ist, ob Stoklasa und andere Autoren reines Lecithin oder ein Gemenge von Phosphatiden vor sich hatten.

[3]) F. Röhmann, Biochemie. Berlin 1908, S. 99.

[4]) Die Weizenkeime werden von Maggi, Zürich, Stadtmühle erhalten. Leider ist die Atmungsenergie der verschiedenen Partien sehr ungleichmäßig. Die in vorliegender Arbeit benutzten Keime atmeten sehr energisch.

Atmungsenergie von in Wasser angequollenen Keimen bestimmt. Die Versuchsobjekte wurden vorher mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert: Alkohol, Äther, Anilin, Chloroform, Essigäthylester, Terpentin, Benzin, Olivenöl, Aceton, Benzol und Toluol. Zu diesem Zwecke wurden 100 g trockener Keime abgewogen und 200 ccm Lösungsmittel aufgegossen. Nach 24 Stunden wurde die Flüssigkeit dekantiert und von neuem die gleiche Menge zugegossen. Auf diese Weise wurden die Keime während 5 Tagen extrahiert. Am fünften Tage verlor die abgegossene Flüssigkeit schon ihre gelbe Farbe. Darauf wurde das Lösungsmittel abfiltriert und die Keime auf mehrmals gewechseltem Filtrierpapier getrocknet; das Trocknen wurde bis zum vollständigen Verschwinden des Flüssigkeitsgeruchs fortgesetzt, was gewöhnlich nach 3 Tagen oder später eintrat.

Von den auf diese Weise extrahierten Keimen wurden jedesmal Portionen zu je 3 g genommen und 30 Minuten in 50 ccm der betreffenden Flüssigkeit (meistenteils Wasser) aufgequollen. Um die Keime beim Aufquellen nicht zu verlieren, legten wir dieselben in dünner Schicht auf Stücke von starkem Filtrierpapier und tauchten letztere in breite Krystallisierschalen, in die 50 ccm der betreffenden Flüssigkeit in dünner Schicht eingegossen waren. Nach dem Aufquellen nahmen wir das Filtrierpapier mit den Keimen, ohne sie in der Flüssigkeit zu verlieren, vorsichtig heraus, trockneten etwas und legten das zusammengerollte Papier mit den Keimen in ein auf Fig. 1 abgebildetes Rohr. Dieses Rohr wurde mit Pettenkoferschen[1]) Röhren verbunden und die Atmung der Keime untersucht, wobei $^1/_2$ Stunde vorher die Luft durch mit Wasser gefüllte Röhren streichen mußte, um die im Apparat befindliche CO_2 zu entfernen.

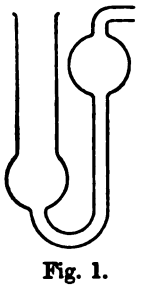


Fig. 1.

Jeder Versuch in gewöhnlichen Bedingungen wurde von einem Kontrollversuch mit Toluol begleitet: 5 ccm Toluol wurden in die Waschflaschen, durch die von CO_2 befreite Luft strich, und 3 ccm Toluol in den unteren Teil der U-förmigen Röhren

[1]) W. Palladin und S. Kostytschew, Methoden zur Bestimmung der Atmung der Pflanzen. (Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, 8, 479, 1910.)

eingeführt. Das verdunstende Toluol wurde immer durch neues ersetzt. Ohne Toluolzugabe trat bald Bakterienentwicklung ein, in den Toluoldämpfen blieb sie dagegen aus.

Wir wollen nunmehr zur Beschreibung der Versuche schreiten.

Versuch 1.

Lebende Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 17,5 bis 19° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	35,2	11,7	25,4	8,4
3 „	54,4	18,1	15,5	5,1
3 „	73,3	24,4	11,6	3,8
In 9 Stunden	162,9	—	—	—
3 „	—	—	8,0	2,7
11 St. 15 Min.	—	—	18,8	1,5
3 Stunden	—	—	4,5	1,5
In 26 St. 15 Min.	—	—	83,8	—

Die im Apparat ohne Toluol befindlichen Keime fingen bald zu faulen an, was an der sehr raschen und intensiven Trübung der Barytröhre und auch an dem Grünwerden des Filtrierpapiers, auf dem die Versuchsobjekte lagen, und an der verstärkten CO_2-Ausscheidung nach 9 Stunden zu erkennen war. Nach dem Öffnen des Apparates verbreiteten die Keime einen widerlichen Geruch. Deshalb wurde von einer weiteren CO_2-Bestimmung in der toluolfreien Portion Abstand genommen. Der Parallelversuch mit Toluol wurde fortgesetzt.

Aus diesem Versuche sehen wir, daß Toluol die lebenden Keime abtötet. Die von den Keimen ausgeschiedene CO_2-Menge sinkt in den Toluoldämpfen mit jeder Stunde.

Versuch 2.

Mit Aceton extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 18 bis 19° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	27,5	9,1	12,0	4,0
3 „	26,1	8,7	8,3	2,7
3 „	25,8	8,6	7,0	2,3
In 9 Stunden	79,4		27,3	

Wir sehen, daß Toluol die Kohlensäureausscheidung der schon mit Aceton abgetöteten Keime stark beeinträchtigt.

Versuch 3.

Mit 95%igem Alkohol extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 17 bis 17,5° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	1,6	0,5	Spuren	0
3 „	1,8	0,6	„	—
3 „	2,8	0,9	„	—
In 9 Stunden	6,2			

Mit Alkohol abgetötete Keime scheiden nur minimale CO_2-Mengen aus. Toluoldämpfe vernichten in diesem Falle die CO_2-Ausscheidung vollständig. Deshalb schien es interessant zu untersuchen, wie sich die mit Toluol, dessen Dämpfe auf die Atmung deprimierend wirken, extrahierten Keime verhalten würden. Folgender Versuch enthält die betreffenden Daten.

Versuch 4.

Mit Toluol extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 19 bis 20° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	28,3	9,4	15,0	5,0
3 „	26,0	8,6	8,6	2,87
3 „	27,5	9,1	10,0	3,33
In 9 Stunden	81,8		33,6	

Der Versuch ergab das überraschende Resultat, daß die mit Toluol extrahierten Keime energischer atmen als die mit allen (oder fast allen) übrigen Lösungsmitteln behandelten. Die Toluoldämpfe üben auch in diesem Falle eine sehr schädliche Wirkung aus.

Versuch 5.

Mit Benzol extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 18 bis 17,5° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	26,8	8,9	15,1	5,0
3 „	26,5	8,8	13,5	4,5
3 „	27,7	9,2	11,5	3,8
In 9 Stunden	81,0		40,1	

Die Resultate sind dieselben wie beim Extrahieren mit Toluol.

Versuch 6.

Mit Olivenöl extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 20 bis 19° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	26,1	8,7	26,1	8,7
3 „	22,7	7,6	17,8	5,9
3 „	25,7	8,5	14,5	4,8
In 9 Stunden	74,5		58,4	

Was die Extraktionsmethode mit Olivenöl anbetrifft, so gleicht sie der oben beschriebenen; nur wurden am 5. Tage die abgepreßten Keime mit Äther behufs Entfernung des Öles übergossen. Nach 24 Stunden wurde der Äther abgegossen und die Keime sorgfältig getrocknet.

Die Toluoldämpfe übten in diesem Falle eine sehr schwache Giftwirkung aus.

Versuch 7.

Mit Terpentin extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 19° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	24,5	8,1	17,2	5,7
3 „	21,4	7,1	11,1	3,7
3 „	21,0	7,0	7,0	2,3
In 9 Stunden	66,9		35,3	

Versuch 8.

Mit Anilin extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 19 bis 18° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	21,0	7,0	19,4	6,4
3 „	20,0	6,6	13,5	4,5
3 „	17.8	5,9	11,7	3,6
In 9 Stunden	58,8		44,6	

Versuch 9.

Mit Chloroform extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 18 bis 17,5° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	19,3	6,4	9,3	3,1
3 „	20,6	6,8	9,0	3,0
3 „	21,4	7,1	9,0	3,0
	61,3		27,3	

In den Versuchen 8 und 9 sind starke Gifte zum Extrahieren benutzt worden; dessenungeachtet ist die Atmungsenergie eine ziemlich bedeutende. Es ist zu beachten, daß im Versuch 9 die CO_2-Ausscheidung der toluolfreien Portion ansteigt. Möglicherweise ist das die Folge einer Infektion. Doch auch die Toluolportion zeigt eine merkwürdige Konstanz der CO_2-Ausscheidung.

Versuch 10.

Mit Benzin extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 19 bis 20° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	16,1	5,36	22,5	7,5
3 „	21,1	7,17	16,9	5,6
3 „	30,0	10,0	14,5	4,8
	67,6	—	53,9	

Die ersten 3 Stunden atmet die Toluolportion energischer, später aber sinkt die Atmungsenergie und das Verhältnis zwischen beiden Portionen nähert sich dem gewöhnlichen.

Versuch 11.

Mit Essigäthyläther extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 18° C.

Versuchsdauer	Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	12,0	4,0
$17^1/_2$ „	12,3	0,7
In $20^1/_2$ Stunden	24,3	

In normalen Bedingungen, d. h. ohne Toluol, atmen die mit dem oben erwähnten Lösungsmittel extrahierten Keime folgendermaßen.

Versuch 12.

Mit Essigäthyläther extrahierte Keime. Temperatur 17,5° C. In Wasser aufgeweicht.

Versuchsdauer	Ohne Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
2 Stunden	8,8	4,41
2 „	10,8	5,41
In 4 Stunden	19,6	—

Versuch 13.

Mit Äthyläther extrahierte Keime. In Wasser aufgeweicht. Temperatur 19 bis 20° C.

Versuchsdauer	Ohne Toluol		Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	14,1	4,73	7,7	2,56
3 „	17,8	5,94	8,3	2,77
3 „	11,0	3,69	8,3	2,77
In 9 Stunden	42,9		24,3	

In diesem Versuche ist die Konstanz der Atmungsenergie der Toluolportion bemerkenswert.

Im nächsten Versuche werden wir sehen, welche Wirkung das Aufquellen der extrahierten Keime im entsprechenden Extrakt hat. Vom auf dem Wasserbade kondensierten Extrakte wurde 1 ccm genommen und mit 49 ccm Wasser gemischt.

Versuch 14.

Mit Äthyläther extrahierte Keime. Im Extrakt aufgeweicht. Temperatur 20 bis 21° C.

Versuchsdauer	Mit Toluol	
	CO_2-Menge	CO_2 pro 1 St.
3 Stunden	7,0	2,3
3 „	7,3	2,4
3 „	6,9	2,3
3 „	6,5	2,1
Nach 12 Stunden	27,7	

Wir sehen, daß das Aufweichen im Extrakt gar keine Wirkung hervorgebracht hat. Das stand auch zu erwarten, da die durch das Lösungsmittel extrahierten Fette und Lipoide nicht mehr in die Zelle zurückwandern und ihre frühere Lage darin einnehmen können.[1])

Wir wollen jetzt die unter dem Einfluß der verschiedenen Extraktoren während der ersten Stunden ausgeschiedenen CO_2-Mengen vergleichen.

---

[1]) Einige von den durch Alkohol extrahierbaren Phosphatiden sind in Wasser löslich. Ihre Wirkung auf die Atmung wird in nächster Zukunft untersucht werden.

Extraktor	Ohne Toluol in 3 Stunden		Mit Toluol in 3 Stunden		Mit Toluol in 9 Stunden	
Lebende	35,2	1	25,4	1	52,5	3
Toluol	28,3	2	15,0	7	33,6	7
Aceton	27,5	3	12,0	8	27,3	9
Benzol	26,8	4	15,1	6	40,1	5
Olivenöl	26,1	5	26,1	2	58,4	1
Terpentin	24,5	6	17,2	5	35,3	6
Anilin	21,0	7	19,4	4	44,6	4
Chloroform	19,3	8	9,3	10	27,3	8
Benzin	16,1	9	22,5[1])	3	53,9	2
Äther	14,1	10	7,7	11	24,3	10
Äthylessigäther . .	8,8	11	12,0	9	—	—
Alkohol	1,6	12	0	12	0	11

Das erste, was in dieser Tafel in die Augen springt, ist, daß das Einführen von Toluol in den Apparat sofort jene Konsequenz in der CO_2-Ausscheidung beseitigt, die wir in den toluolfreien Portionen konstatieren. Das tritt besonders scharf in den beiden beiliegenden Kurven hervor (siehe Fig. 2 und 3).

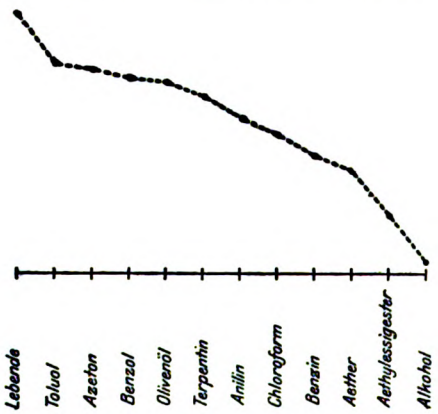


Fig. 2. CO_2-Menge in Milligramm nach 3 Stunden ohne Toluol.

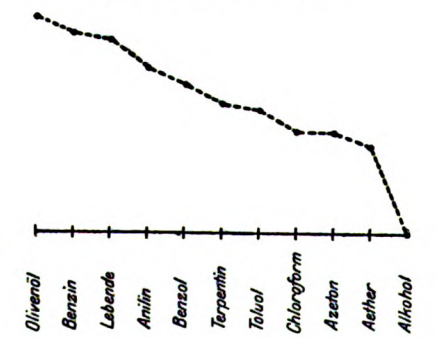


Fig. 3. CO_2-Menge in Milligramm nach 9 Stunden mit Toluol.

Wir haben also gesehen, wie die verschiedenen Extraktoren im allgemeinen auf die Atmung einwirken. Es war interessant, ihre Einwirkung auf das primäre Stadium der Atmung — die Gärung — zu untersuchen. Zu

[1]) Die mit Benzin und Essigäther extrahierten Keime schieden während der ersten 3 Stunden in Toluoldämpfen mehr CO_2 als ohne Toluol aus. Da das vorhergehende Aufweichen im Wasser nur kurz war, so entsteht die Frage, ob nicht das Toluol ein stärkeres Aufquellen begünstigt hätte.

diesem Zwecke wurde Hefanol (durch Trocknen abgetötete Hefe)[1]) genommen.

Hefanol wurde wie oben beschrieben mit Aceton bzw. mit Alkohol extrahiert und 3 Portionen zu je 2 g genommen: gewöhnliches Aceton und Alkohol-Hefanol. Dieselben wurden in die auf Fig. 1 abgebildeten Röhren gelegt und 50 ccm einer 20%igen Saccharoselösung hinzugefügt.

Versuch 15.

Versuchsdauer	Gewöhnliches Hefanol	Aceton-H.	Alkohol-H.
3 Stunden	89,5	84,7	60,0
3 „	53,6	49,7	43,5
17½ „	173,4	165,4	106,3
22 „	144,1	131,9	79,0
27½ „	120,1	76,9	80,1
73 Stunden	580,7	508,6	368,9

Die Temperatur betrug 18 bis 20° C. Auch dieser Versuch ergab das die früheren Ergebnisse bestätigende Resultat, daß die CO_2-Ausscheidung des Acetonhefanols etwas geringer als die des gewöhnlichen und viel stärker als die des Alkoholhefanols ausfiel. Doch scheidet das Alkoholhefanol relativ viel mehr CO_2 aus als Alkoholkeime. Diese Erscheinung kann vielleicht dadurch erklärt werden, daß die Keime in lebendem, das Hefanol aber in abgetötetem Zustande mit Alkohol bearbeitet wurde. Um zu zeigen, wie die Energie der CO_2-Ausscheidung im vorhergehenden Versuche sank, ist folgende Tabelle angeführt, in der die CO_2-Mengen für 1 Stunde umgerechnet sind.

Versuchsdauer	CO_2-Menge pro 1 Stunde		
	Gewöhnl. Hefanol	Aceton-H.	Alkohol-H.
3 Stunden	29,8	28,3	20,0
3 „	17,8	16,5	14,5
17½ „	10,5	9,4	6,4
22 „	6,5	5,9	3,5
27½ „	4,3	2,7	2,9

In den obenstehenden Versuchen ist die verschiedene Einwirkung der Lösungsmittel auf die CO_2-Ausscheidung der Weizenkeime und des Hefanols gezeigt worden. Wovon hängt diese Wirkung ab? Man kann diese Frage auf verschiedene Weise beantworten. Um diese verwickelte Frage näher aufzuklären, wurden je 10 g Keime genommen und die Lipoide durch irgend ein Lösungsmittel daraus extrahiert. Das Extrakt wurde bis zum vollständigen Verschwinden des Extraktgeruchs

[1]) Bezogen von Anton Schroder, München, Landwehrstr. 45.

verdunstet und gewogen; dann wurde darin das P_2O_5 nach Neumann[1]) bestimmt.

In folgender Tabelle ist die Menge der Lipoide, des P_2O_5 und vergleichshalber auch die während der ersten 3 Stunden stündlich ausgeschiedene CO_2-Menge angeführt.

CO_2 pro 1 Stunde	Aceton 9,17 mg	Benzol 8,94 mg	Chloroform 6,43 mg	Äther 4,73 mg	Alkohol 0,53 mg
Lipoide in g . . {	0,612	0,923	1,021	1,461	1,575
	0,735	1,005	1,2	1,363	1,662
Mittel	0,698	0,964	1,11	1,412	1,628
Lipoide in % . . .	6,98	9,64	11,1	14,12	16,28
P_2O_5 in g	0,0594	0,0783	0,092	0,095	0,134
P_2O_5 in %	0,594	0,783	0,92	0,95	1,34

Diese Tabelle ist auf der beiliegenden Kurve graphisch veranschaulicht (Fig. 4).

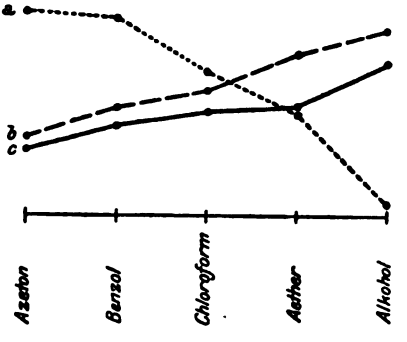


Fig. 4. *a*: Menge der ausgeschiedenen Kohlensäure, *b*: Menge der Lipoide, *c*: Menge des P_2O_5.

Aus den angeführten Versuchen folgt:

1. Die Atmungsenergie der durch verschiedene Extraktionsmittel getöteten Weizenkeime steht in engem Zusammenhang mit den Eigenschaften des betreffenden Extraktionsmittels.

2. Im allgemeinen läßt sich behaupten, daß das betreffende Extraktionsmittel um so schädlicher auf die Kohlensäureausscheidung der abgetöteten Pflanzen einwirkt, je mehr Lipoide und Phosphor es letzteren entzieht.

[1]) Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 115.

3. Um abgetötete Pflanzen mit wirksamen Fermenten zu erhalten, muß man Substanzen anwenden, in denen die Lipoide wenig löslich sind.[1])

4. Toluoldämpfe wirken schädlich auf die Kohlensäureausscheidung der abgetöteten Weizenkeime ein. Die Giftigkeit derselben ist verschieden und hängt von der Natur des angewandten Extraktionsmittels ab.

Welche Bedeutung haben nun die Lipoide für den Atmungsprozeß der Pflanzen?

Zweifellos beruht die Hauptbedeutung der Lipoide auf ihrem Phosphorgehalt. Die interessanten Untersuchungen von Harden und Young[2]) zeigten, daß die Phosphorsäure an der alkoholischen Gärung unmittelbar beteiligt ist, indem sie eine Verbindung mit Glucose bildet. Da der Gärungsprozeß als das primäre Stadium des Atmungsprozesses aufzufassen ist,[3]) so mußte man vermuten, daß die Phosphorsäure nicht nur die alkoholische Gärung, sondern auch die Atmung stimulieren würde, was auch durch die Untersuchungen von N. Iwanow[4]) erwiesen worden ist. Nach den Arbeiten von Harden und Young gewinnen auch diejenigen Wintersteins und Hiestands besonderes Interesse; letztere zeigten, daß viele Phosphatide ebenfalls Verbindungen mit Kohlenhydraten vorstellen.

Allerdings bemerken wir keine vollkommene Proportionalität zwischen der Menge des extrahierten Phosphors und dem Sinken der Atmungsenergie. Das kann aber von verschiedenen Umständen abhängen. Erstens extrahieren die verschiedenen Lösungsmittel nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ verschiedene Lipoide von ungleicher physiologischer Bedeutung.

---

[1]) E. Buchner und seine Mitarbeiter wandten anfangs zur Gewinnung von abgetöteter Hefe (Zymin) Alkohol und Äther an, gingen aber später mit Recht zum Aceton über, das wirksamere Präparate liefert (E. Buchner, Zymasegärung). Um die Pflanze abzutöten, muß das extrahierende Agens in dieselbe eindringen. Im entgegengesetzten Fall wird die Pflanze auch nach längerem Verbleiben in heißem Alkohol am Leben bleiben (W. Schubert, Flora 100, 68, 1909).

[2]) Harden und Young, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 26, 178, 1910.

[3]) W. Palladin, diese Zeitschr. 18, 151, 1909.

[4]) Nicolaus Iwanow, Bull. de l'Acad. d. Sc. de St. Petersbourg 1910, 303 (russisch).

Das, was wir jetzt vorläufig als Lecithin bezeichnen, wird sich mit der Zeit als verschiedene Phosphatide herausstellen. So ist im menschlichen Gehirn nach Fränkel[1]) nicht Lecithin, sondern ein neues Phosphatid Sahidin enthalten. Zweitens üben die verschiedenen Extraktionsmittel auch eine verschiedene Wirkung auf die physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas aus. So koaguliert z. B. Alkohol die Eiweißkörper. Durch diesen Umstand erklärt sich vielleicht die Tatsache, daß mit Alkohol behandelte Weizenkeime sehr schwach atmen.

Wenn wir die Lipoide entfernen, so zerstören wir die normale Plasmastruktur. Wir entziehen dem Plasma das Bindemittel, das seine heterogenen Bestandteile zu einem Ganzen verbindet. Einer von uns[2]) hat gezeigt, daß schon die mechanische Zerstörung der Plasmastruktur die Atmung der Pflanzen sehr schädlich beeinflußt.

Endlich beteiligen sich die Lipoide auch an den Oxydationsprozessen. Viele Forscher[3]) haben auf die Fähigkeit der Lipoide zur Sauerstoffabsorption hingewiesen.

Koch[4]) sagt: „Schon an der Luft dunkelt Lecithin, und beim Kephalin findet eine Art Verharzung mit solcher Geschwindigkeit statt, daß man an eine Oxydase erinnert wird."

Erlandsen stellte die leichte Oxydierbarkeit des Cuorins fest. Einer von uns[5]) zeigte, daß in den Pflanzen der Oxydationsprozeß unter Mitwirkung besonderer Atmungschromogene stattfindet, die bei der Oxydation verschiedene Pigmente liefern. Wenn man berücksichtigt, daß Cholesterin und andere Lipoide leicht verschiedene farbige Reaktionen geben, so entsteht unwillkürlich die Frage, ob diese Körper nicht vielleicht in gewissen Beziehungen zu den erwähnten Atmungspigmenten stehen? Die ersten in dieser Richtung unternommenen Vorversuche sprechen zugunsten einer solchen Vermutung. Nach

[1]) S. Fränkel, diese Zeitschr. 24, 268, 1910.

[2]) W. Palladin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 44, 1906.

[3]) W. Koch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 181, 1902 bis 1903. — A. Erlandsen, ebenda, 51, 96, 1907. — W. Heubner, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 59, 420, 1908. — H. Vageler, diese Zeitschr. 17, 217, 1909.

[4]) W. Koch, l. c., S. 187.

[5]) W. Palladin, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 125, 378, 389; 27, 101, 1909.

Fränkel und Dimitz[1]) existieren in den Geweben Substanzen ungesättigter Art, die als Phosphatide erkannt wurden. Diese sind bei einem bestimmten Aufbau ihres Moleküls in der Lage, an ihrer doppelten Bindung molekularen Sauerstoff anzulagern. Ebenso wie die Oxydation läßt sich auch die Reduktion in den Geweben durch die Gegenwart und die Entwickelung dieser Substanzen erklären. Dieser Substanz gaben die Verf. den Namen Intermediärkörper und nannten demzufolge ihre Anschauung über die Gewebeatmung die „Theorie der Gewebeatmung durch Intermediärkörper". In den Pflanzen solcher Intermediärkörper sind Atmungschromogene.

[1]) S. Fränkel und L. Dimitz, Wiener klin. Wochenschr. 1909, Nr. 51. Zitiert nach Biochem. Centralbl. 9, 860, 1910.

Über das Vorkommen und den Nachweis des Allantoins im Menschenharn.

Von

Karl Ascher.

(Aus der I. medizinischen Klinik der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 3. Mai 1910.)

Die Frage, ob der menschliche Harn normalerweise Allantoin enthält, ist durch die Untersuchungen Wiechowskis (1) endgültig im bejahenden Sinne beantwortet worden. Der Mangel einer geeigneten Methode zum Nachweis kleinster Allantoinmengen brachte es mit sich, daß die früheren Versuche, im Menschenharn Allantoin nachzuweisen, zu keinem Resultate geführt haben.

Nach dem heutigen Stande der Frage ist das bei jenen Untersuchungen begreiflich, die nach den Methoden vorgenommen wurden, die Buniva und Vauquelin (2) bzw. Wöhler (3) für den Allantoinnachweis in der Allantoisflüssigkeit der Kühe bzw. im Kälberharn verwendet haben. Es handelte sich hier um das Auskrystallisierenlassen aus der eingeengten unbehandelten oder mit Bleiessig gereinigten Flüssigkeit (4), eine Methode, die einerseits bei der größeren Löslichkeit des Allantoins im Harn gegenüber Wasser (5), andererseits bei der leichten Zersetzlichkeit des Allantoins (6) nur beim Vorhandensein von viel Allantoin Krystalle liefern konnte. Überdies wurde hierbei zur Entfärbung gewöhnlich Tierkohle verwendet (3, 7); nach unseren Erfahrungen ist anzunehmen, daß die geringen Allantoinmengen des Menschenharns bei Behandlung mit Tierkohle zum größten Teil adsorbiert werden und dadurch für den Nachweis verloren gehen.

Nach Wöhlers Methode fanden kein Allantoin beim Menschen Frerichs und Städeler (8), Köhler (9) und Feith (4). Die mehrfach zitierte Angabe, daß Schottin nach Eingabe von Tannin im Menschenharn Allantoin gefunden habe, konnte ich an der angegebenen Stelle (10) nicht auffinden. Meißner (11) konnte auch nach Reinigung mit Baryt und Fällung mit Alkohol und Äther kein Allantoin im Menschenharn finden.

Neuere Untersucher verwenden entweder die Fällbarkeit des Allantoinsilbers durch Ammoniak [vgl. Huppert-Neubauer (12, 14 und 5)] oder die Fällung des Allantoins durch Quecksilbersalze. Meist begnügte man sich, den Stickstoffgehalt der Metallfällung zu bestimmen und danach die Allantoinmenge zu berechnen. Wahrscheinlich durch den mitgefällten Harnstoff (15) gelangten manche auf diesem Wege unter Umständen zu unwahrscheinlich hohen Werten für die menschliche Allantoinausscheidung. So bestimmte Pfeifer (16) im eigenen Harn nach der Methode O. Loewis (14) bis über 2 g Allantoin. Andererseits fanden kein Allantoin mit Fällung durch Quecksilbernitrat oder Silbernitrat und Ammoniak Moscatelli (26), mit Meißners Sublimat-Alkali-Fällung Th. Cohn (17), O. Loewi (14) auch nicht mit der von ihm angegebenen Methode der Fällung mit Silbernitrat und Ammoniak nach Vorbehandlung mit Mercuronitrat. O. Loewi erhielt mit dieser Methode auch nach Thymus-Fütterung kein Allantoin und bekam das in den Körper eingeführte nur in geringen Mengen wieder. Poduschka (5) fand für die physiologische Ausscheidung des Menschen minimale N-Werte. Bei einer Phosphorvergiftung fand er kein Allantoin.

Die zahlreichen Widersprüche auf diesem Gebiete scheinen nun insoweit aufgeklärt, als durch die grundlegenden Untersuchungen Wiechowskis das Vorkommen von Allantoin im normalen Menschenharn durch Reindarstellung und exakte chemische und physikalische Charakterisierung nachgewiesen wurde. Die Befunde Wiechowskis wurden von Schittenhelm und K. Wiener bestätigt (24). Wiechowski (13) fällt das Allantoin mit seinem Reagens (0,5% Quecksilberacetat in 20% Natriumacetat) in einer Flüssigkeit, in der das Allantoin bei sehr geringer Harnstoffkonzentration angereichert ist. Diese Anreicherung ist in dem mit Mercuronitrat oder mit Phosphorwolframsäure, Blei und Silber vorbehandelten Harne durch fraktionierte Fällung mit 20%igem Mercurinitrat vorzunehmen. Der Krystallisation gehen mehrfache Reinigungen voraus, bezüglich derer auf die ausführlichen Angaben Wiechowskis verwiesen sei.

Im folgenden möchte ich mir erlauben, zu der eben berührten Frage über das Vorkommen von Allantoin im Menschenharn einen kleinen Beitrag zu liefern. Die mitzuteilenden Versuche habe ich mit Unterstützung von Herrn Dr. O. Adler auf der Klinik des Herrn Hofrats Prof. Přibram ausgeführt; sie beziehen sich auf das Vorkommen des Allantoins sowohl im Harn des normalen Menschen als auch im Harn des Hungernden und des Kranken. Ursprünglich war es meine Absicht, diese Verhältnisse an einer größeren Versuchsreihe zu studieren, allein das stieß insofern auf Schwierigkeiten, als es zurzeit eine orientierende Probe — etwa eine Farbreaktion — für Allantoin nicht gibt, die in einem gegebenen Fall einen raschen Einblick

in die qualitativen und allenfalls auch in die quantitativen Verhältnisse gestatten würde. So bleibt nichts übrig, als jeden einzelnen Fall dem ganzen Gange der Methodik zu unterziehen, was jedesmal längere Zeit in Anspruch nimmt. Mit Rücksicht auf eine solche orientierende Probe habe ich einige Versuche angestellt, über die weiter unten berichtet wird. Im Anschluß daran möchte ich einige Versuche anführen, die sich auf die Adsorption des Allantoins durch Tierkohle beziehen. Diese Verhältnisse näher zu beachten, erschien deshalb notwendig, weil von einigen früheren Autoren bei der Darstellung des Allantoins aus Harn die Tierkohle zur Reinigung mehrfach verwendet worden ist. Bei einem Stoffe, der in physiologischen Flüssigkeiten in so geringen Mengen vorkommt wie das Allantoin, ist bei Verwendung von Tierkohle oder ähnlichen Adsorbenzien die Adsorptionsfähigkeit dieser Substanzen in bezug auf die quantitativen Verhältnisse nicht ohne Belang.

Zunächst sei ein Fall mitgeteilt, bei dem es sich um die Untersuchung des Harnes eines 26jährigen gesunden Mannes handelt. Die Untersuchungen geschahen genau nach den Angaben Wiechowskis. Da jedoch in diesem Falle in methodischer Hinsicht einige unwesentliche Abänderungen vorgenommen wurden, die bei weiteren Fällen nicht wieder in Anwendung kamen, verzichte ich auf die Wiedergabe des Versuchsprotokolls und verweise auf die bei Fall IV (Leukämie) gemachten näheren Angaben.

Fall I. 26jähriger gesunder Mann.

A. Tagharn: 550 ccm. Frei von abnormen Bestandteilen.

Zur Allantoinbestimmung in Arbeit genommen 445 ccm.

Zur Wägung gebracht 4 mg Allantoin. Wohl ausgebildete farblose Krystalle, einzeln und in Drusen. F = 235° unter Zersetzung (bei raschem Erhitzen).

Farbreaktion mit Pepton und Schwefelsäure nach Wiechowski positiv; Violettfärbung, die durch Zusatz von Eisenchlorid deutlich verstärkt wird. (Näheres über diese Reaktion s. u.)

Es berechnet sich also für den Tagharn (550 ccm) ein Gehalt von 5 mg Allantoin.

B. Nachtharn: 800 ccm.

In Arbeit genommen 530 ccm.

Zur Wägung gebracht 2 mg Allantoin.

Auf die Nachtportion berechnet: 8 mg Allantoin.

Es ergibt sich also für die 24stündige Menge eine Gesamtausscheidung von 8 mg Allantoin. Die tagsüber ausgeschiedene Menge ist größer (5 mg) als die während der Nacht ausgeschiedene (3 mg). Mit Rücksicht auf die Tatsache, daß das Allantoin beim Menschen als ein

Endprodukt anzusehen ist, das im Körper nicht weiter zerstört wird, sondern nach Wiechowski (18) rasch wieder den Körper verläßt, wäre die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß die tagsüber zugeführte Nahrung für den höheren Allantoingehalt des Tagharns verantwortlich zu machen sei. Auf die Möglichkeit einer alimentären Allantoinausscheidung hat Schittenhelm (33) hingewiesen.

In der Tat ist Allantoin in Pflanzenteilen mehrfach gefunden worden. Schultze und Barbieri (19) fanden es in den Blattknospen von Acer pseudoplatanus, Schultze und Boßhard (20) bei Platanus orientalis bis 1% der Trockensubstanz beim Eindampfen des mit Bleiessig gereinigten Extraktes aus den Sprossen sowie in der Rinde von Aesculus Hippocastanum (in 1 kg Rinde 0,5 g Allantoin); Richardson und Crampton (21) in Weizenkeimen bis zu 0,5%; Lippmann (22) im Rübensaft; Scurti und Perciabosco (23) in Tabaksamen.

Daß aber auch unabhängig von der Nahrung Allantoin im Menschenharn vorkommt, beweist folgender Versuch, der an einem hungernden Menschen ausgeführt wurde.

Fall II. Ein 30jähriger gesunder Arzt nahm vom 26. Dezember 4 Uhr nachmittags bis 8 Uhr abends des nächsten Tages — also durch 28 Stunden — keinerlei feste Nahrung zu sich; in den ersten 4 Stunden der Versuchszeit wurden kleine Mengen Wasser getrunken, in den anschließenden 24 Stunden auch das Trinken eingestellt. Die 24stündige Harnmenge kam zur Untersuchung. Es gelang, 1 mg reines Allantoin in Krystallform abzuscheiden. Mischungsschmelzpunkt mit reinem Allantoin (Merck): 235° (unter Zersetzung). Farbreaktion mit Pepton und Schwefelsäure (s. u.) positiv.

Die Menge von 1 mg erscheint im Vergleich zu der bei Fall I gefundenen allerdings recht gering. Das gestattet aber nicht etwa eine Deutung in dem Sinne, daß die gewöhnliche Kost auf die Allantoinausscheidung von Einfluß sein müsse. Dafür spricht auch Fall III, in dem bei einer Versuchsperson, die hinreichend Nahrung zu sich nahm, eine äußerst geringe Allantoinausscheidung beobachtet wurde. Hier dürften eben individuelle Verschiedenheiten eine Rolle spielen.

Fall III. 23jähriger Student der Medizin.

24stündige Harnmenge 1300 ccm; frei von pathologischen Bestandteilen. Darstellung analog wie bei Fall IV. Bei allmählichem Verdunsten der letzten Fraktion schieden sich spärliche, kleinste farblose Krystalldrusen ab, die nach ihren physikalischen und sonstigen Eigenschaften als Allantoin anzusprechen waren. Zur Wägung erschien die Menge zu gering.

Weiters wurde der Harn eines Leukämikers auf Allantoin untersucht. Vor längerer Zeit (1887) hat Stadthagen (25) bei Leukämie im Harn vergeblich nach Allantoin gesucht. Es gelang ihm nicht, in etwa 6 l Harn eines Leukämikers, der vorher 5 g Natriumurat bekommen hatte, Allantoin nachzuweisen. Er beobachtete hierbei auch, daß bei der Fällung des Allantoins nach Meißner durch Sublimat unter Zusatz

von Alkali die Anwesenheit des Harnstoffes störend wirke, und meinte, es wäre zweckmäßig, den Harnstoff vor der Fällung von dem Allantoin zu trennen. Übrigens fand Stadthagen auch bei Hunden kein Allantoin, auch nicht nach Zufuhr von Harnsäure.

Wir selbst konnten nach der Methode Wiechowskis bei Leukämie in einer Harnmenge, die weit geringer war als die von Stadthagen untersuchte, Allantoin in Krystallform abscheiden.

Fall IV. Leukämie. Harnmenge: 500 ccm.

Das in Arbeit genommene Quantum betrug mit Einrechnung der Spülwässer und nach Zusatz von so viel Schwefelsäure, daß die Lösung 1%ig war, 730 ccm.

Davon wurden 600 ccm mit 150 g Phosphorwolframsäure in Substanz gefällt, vom Niederschlag auf der Nutsche abgesaugt, im Filtrat die überschüssige Säure mit Bariumhydroxyd entfernt, abermals abgesaugt. Ins Filtrat wird bis zu neutraler Reaktion Kohlensäure eingeleitet, sodann Natriumcarbonat in Substanz bis zu schwach alkalischer Reaktion zugesetzt und wiederum abgenutscht. Filtrat 510 ccm. Hierauf wird mit Salpetersäure angesäuert und 4,16 g Silbernitrat (die berechnete Menge zur Ausfällung des Chlors) zugesetzt. Dann wird abgenutscht und mit Wasser nachgewaschen. Das Filtrat erwies sich frei von Chlor und Silber. Die Lösung wird mit einer bestimmten Menge Mercurinitrat gefällt (ausgetastet, bis das Filtrat von dem Quecksilberniederschlag mit Allantoin reagiert, wobei erfahrungsgemäß alles Allantoin ausgefällt ist). Die Flüssigkeit bleibt 12 Stunden stehen. Dann wird die überstehende Flüssigkeit vorsichtig durch ein großes Filter gegossen und der Niederschlag mehrmals mit Wasser dekantiert, die Spülflüssigkeit immer nach völligem Absetzen auf das Filter gegossen. Die geringe Menge des Niederschlages, die aufs Filter geraten war, wurde zur Hauptmenge zurückgespritzt und die Fällung mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach völliger Zersetzung wird der überschüssige Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom entfernt. Hierauf wird — ohne von dem Schwefelquecksilber abzufiltrieren — nach Neutralisation mit Natriumcarbonat, mit Bleiessig ausgefällt. Vom Niederschlag wird auf der Nutsche abgesaugt, mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, filtriert, der Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom ausgeblasen, die Flüssigkeit mit Soda neutralisiert. Hierauf wird mit dem Allantoinreagens Wiechowskis gefällt. Der Niederschlag setzte sich über Nacht ab und wurde auf einem kleinen Filter gesammelt und gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr mit Mercurinitrat reagierte. Die Fällung wird in eine kleine Schale gespritzt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Hierbei trat anfangs Gelbfärbung ein, die auf noch vorhandene Verunreinigungen hinweist. Dann wird — ohne zu filtrieren — auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, der Rückstand in wenig heißem Wasser gelöst, durch ein kleines Filter filtriert, mit wenig Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird auf ein kleines Volumen eingeengt. Es bleibt ein brauner Sirup zurück, der, mit wenig Mercurisulfat in schwefelsaurer Lösung versetzt, über Nacht stehen gelassen wird. Dann wird

durch ein kleines Filter filtriert und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das noch gelbliche Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff behandelt, der überschüssige Schwefelwasserstoff durch Luft vertrieben, dann wird filtriert und das nunmehr farblose Filtrat mit Natriumcarbonat neutralisiert. Jetzt wird zum zweitenmal mit Allantoinreagens gefällt und der Niederschlag über Nacht absetzen gelassen. Hernach wird durch ein kleines Filter filtriert, mit wenig Wasser sulfatfrei gewaschen. Der Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, wobei gleich Schwarzfärbung auftritt — ein Zeichen, daß Verunreinigungen in erheblicher Menge nicht mehr vorhanden sind. Auf dem Wasserbade wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand in wenig heißem Wasser gelöst, durch ein aschefreies Filterchen filtriert. Das Filtrat zeigt noch leichte Gelbfärbung. Nach Einengen auf ein kleines Volumen und folgendem Abkühlen beobachtet man das Anschießen von Kryställchen. Zur Vollendung der Krystallisation wird über Nacht bedeckt stehen gelassen, die Krystalle mit wenig eiskaltem Wasser auf ein Filterchen gebracht und endlich bei 100° getrocknet.

Ausbeute 4 mg Allantoin, fast farblose Kryställchen, zum Teil in Drusen vereinigt. F = 233 bis 234° bei schnellem Erhitzen. Reaktion mit Pepton und Schwefelsäure: Violettfärbung, die durch Zusatz eines Tropfens sehr verdünnter Eisenchloridlösung deutlich vertieft wird. Vor dem Spektroskop zeigte die Lösung ein Band im gelben Anteil des Spektrums.

Auf die Gesamtmenge berechnet, ergibt sich eine Ausscheidung von **5,6 mg Allantoin.**

Bei einigen anderen Fällen gelang es nicht, wägbare Mengen von Allantoin zu isolieren.

Im Harn einer perniziösen Anämie wurde überhaupt kein Allantoin gefunden. Man könnte daran denken, daß die beim Menschen ohnehin geringe und im Vergleich mit der Tierreihe gewissermaßen rudimentär gewordene Allantoinbildung bei schwerem Kräfteverfall versiegt.

Im Harn eines Patienten mit Morbus Addisoni konnte ich aus der 5 Tage vor seinem Tode gesammelten Tagesmenge (800 ccm) keine deutlichen Krystalle erhalten. Doch zeigte der Rückstand nach wiederholter Reinigung Neigung zur Krystallisation; ein Tropfen des mit wenig Wasser aufgenommenen Rückstandes zeigte, auf einem Objektträger verdampft, unter dem Mikroskop Kryställchen von der Gestalt der Allantoinkrystalle, und da überdies der Rest des Rückstandes eine deutliche Pepton-Schwefelsäure-Reaktion zeigte, ist es wahrscheinlich, daß auch in diesem Falle Allantoin vorhanden war.

Verhalten des Allantoins zur Tierkohle.

Mit Rücksicht darauf, daß namentlich von mehreren älteren Autoren Tierkohle zur Reinigung des Allantoins verwendet wurde, und da übrigens in letzter Zeit dieses Adsorbens wiederum von

einigen Autoren in Betracht gezogen wurde, erschien es von Interesse, das Verhalten von Allantoinlösungen gegenüber Tierkohle zu beobachten. Auf die adsorbierenden Eigenschaften der Tierkohle gegenüber Allantoin hat schon Wiechowski aufmerksam gemacht.

Zu den Versuchen verwendete ich eine Lösung, die in 100 ccm 0,1194 g Allantoin enthielt. Eine gemessene Menge der Lösung wurde mit einer bestimmten Menge Tierkohle (Carbo animalis puriss. Merck) eine bestimmte Zeit hindurch unter häufigem Schütteln auf konstanter Temperatur gehalten. Dann wurde von der Tierkohle möglichst rasch abfiltriert, eine gemessene Menge des Filtrates eingedampft und der Rückstand als Allantoin gewogen. Aus der Reihe der so angestellten Versuche seien die folgenden in einer Tabelle angeführt:

Allantoinlösung ccm	Tierkohle g	Temperatur Grad	Zeit	Gewogener Rückstand in 100 ccm g	Adsorbiertes Allantoin %
150	5	50	10 Min.	0,0388	66
150	10	50	10 „	0,0122	91
150	5	37	15 St.	0,0250	79
150	10	37	15 „	0,0210	82

Aus den in der Tabelle angeführten Versuchen ergibt sich, daß sehr beträchtliche Mengen Allantoin von Tierkohle zurückgehalten werden. Bei einer Temperatur von 50° und Verwendung von 10 g Tierkohle auf 150 ccm Flüssigkeit wurden über 90% Allantoin zurückgehalten, so daß das Filtrat von der Tierkohle praktisch als allantoinfrei gelten konnte. Es trat auch mit dem so empfindlichen Wiechowskischen Reagens erst nach längerem Stehen eine leichte Trübung auf. Berücksichtigt man nun die Tatsache, daß in physiologischen Flüssigkeiten des Menschen ohnedies oft nur sehr geringe Mengen Allantoin vorkommen, so kann es keinem Zweifel unterliegen, daß die Verwendung von Tierkohle die quantitative Ausbeute illusorisch machen kann, und da ferner die etwa nicht adsorbierten kleinen Allantoinmengen unter der Grenze der Nachweisbarkeit bleiben können, so kann sich auch das Vorhandensein des Allantoins der Beobachtung überhaupt entziehen.

Farbenreaktionen des Allantoins.

Schon eingangs wurde auf den Mangel einer orientierenden Probe in Form einer Farbenreaktion zum Nachweis von Allantoin hingewiesen. Es erschien mir wünschenswert, eine derartige Probe zu besitzen, um mich mit ihrer Hilfe an einer größeren Reihe von Fällen rasch über die Anwesenheit und, wenn möglich, auch ungefähr über die Menge des Allantoins zu orientieren.

Die Furfurolreaktion gibt zwar mit Allantoin einen positiven Ausschlag, ist aber nach Schiff (27) bei Gegenwart von Harnstoff nicht verwendbar, da dieser die Reaktion ebenfalls gibt.

Im Jahre 1908 hat B. Tollens (28) die Naphthoresorcin-Reaktion zum Nachweis der Glucuronsäure im Harn beschrieben. C. Tollens (29) berichtete hernach, daß diese Reaktion in einer großen Reihe von Fällen im Menschenharn einen positiven Ausschlag gebe. I. A. Mandel und C. Neuberg (30) sowie C. Neuberg (31) haben diese Reaktion einem eingehenden Studium unterzogen und gezeigt, daß sie mit einer großen Reihe anderer Stoffe, besonders aus der Reihe der Aldehyd- und Keto-Säuren ähnliche Färbungen ergibt. Sie beobachteten, daß von physiologisch wichtigen Körpern das Allantoin, das Diureid der Glyoxylsäure, die Reaktion genau so gebe wie die Glyoxylsäure selbst. O. Sittig (32) hat bei Gelegenheit anderer Versuche in Ascitesflüssigkeiten, die zumeist dem Material der ersten medizinischen Klinik entstammten, häufig die Naphthoresorcinprobe angewendet, ohne jedoch hieraus bindende Schlüsse auf das Vorhandensein der Glykuronsäure zu ziehen, und zwar vor allem mit Rücksicht auf die erwähnten Beobachtungen von Neuberg und Mandel. Sittig beobachtete sogar, daß unter gewissen Umständen selbst der negative Ausfall der Naphthoresorcinprobe nicht unbedingt gegen das Vorhandensein von Glucuronsäure sprechen müsse, da gelegentlich der positive Ausfall eine Behinderung erfahren kann.

Mir selbst kam es darauf an, die Verwendbarkeit der Naphthoresorcinreaktion für den Allantoinnachweis zu prüfen. Zunächst konnte ich die Angabe bestätigen, daß die Probe mit Glyoxylsäure einen positiven Ausschlag gibt. Doch ist nach meinen Beobachtungen das spektroskopische Bild hierbei

anders als bei Gegenwart von Glucuronsäure, da diese einen Streifen nahe der D-Linie gibt, während bei Glyoxylsäurezusatz ein Band weiter links, im Rot, sichtbar wurde. Dies erschien auch insofern von Interesse, als bei Anwesenheit größerer Mengen von Allantoin ebenfalls ein Streifen im Rot auftrat, der in seiner spektralen Lage mit dem Glyoxylsäurestreifen identisch zu sein schien. Doch käme eine Unterscheidung gegenüber Glyoxylsäure für Harnuntersuchungen vielleicht weniger in Betracht, da nach den Untersuchungen von O. Adler (33) die Gegenwart unveränderter Glyoxylsäure im Menschenharn bisher nicht nachgewiesen ist. Quantitative Versuche haben mir gezeigt, daß die Empfindlichkeit der Probe für Allantoin nicht hinreichend groß ist, um sie zum Nachweis des Allantoins in physiologischen Flüssigkeiten verwendbar zu machen (s. u.).

Hierbei machte ich eine Beobachtung, die mir für die Beurteilung der Naphthoresorcinprobe im allgemeinen nicht ohne Interesse zu sein scheint. Wurde nämlich die Naphthoresorcinprobe entsprechend der Vorschrift, jedoch mit etwas größeren Mengen Naphthoresorcin angestellt, so trat auch bei der leeren Probe, bei Abwesenheit irgend eines zu prüfenden Stoffes, ein deutliches Band im roten Anteil des Spektrums auf, das von dem bei Gegenwart der Glyoxylsäure und des Allantoins erhaltenen nicht zu unterscheiden war. Ob sich bei feineren spektralen Messungen Unterscheidungsmerkmale ergeben würden, vermag ich nicht zu sagen; doch kommen derartige Messungen für die Ausführung einer orientierenden Probe wohl auch nicht in Betracht. Jedenfalls wird die erwähnte Tatsache bei Untersuchungen mit Hilfe dieser Reaktion zu berücksichtigen sein. Es sei erwähnt, daß bei der leeren Probe auch im grünen Anteil des Spektrums regelmäßig ein Streifen beobachtet wurde, worauf bei spektroskopischen Untersuchungen ebenfalls Rücksicht zu nehmen wäre.

Die folgenden Versuche wurden, um eine leichtere Dosierung des Naphthoresorcins zu ermöglichen, mit alkoholischer Naphthoresorcinlösung (10 auf 100) angestellt, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß die Proben nicht anders ausfielen als wenn Naphthoresorcin in Substanz zugesetzt wird. Nur beim Aus-

schütteln mit Äther mußte, wenn mehr Alkohol zugesetzt war, durch Wasserzusatz die Trennung der Flüssigkeitsschichten befördert werden.

Versuch 1. 5 ccm destilliertes Wasser, 5 ccm rauchende Salzsäure, 0,6 ccm 10%iger Naphthoresorcinalkohol werden 60 Sekunden lang gekocht, nach 4 Minuten abgekühlt, mit Äther ausgeschüttelt. Ätherextrakt grün; zeigt vor dem Spektroskop verwaschene Verdunkelung im Blaugrün.

Versuch 2. Wie 1; statt 0,6 ccm Naphthoresorcinalkohol, 3 ccm; Extrakt braungrün (bei Verdünnung grün), zeigt einen Streifen im Rot, einen andern im Grün, einen dritten — wenig deutlichen — im Gelb nahe der D-Linie. Bei Verdünnung des Extraktes bleibt der Streifen im Grün, zuletzt als verwaschene Verdunklung, am längsten sichtbar.

Versuch 3 und 4. Wie 1 und 2 unter Zusatz einiger Tropfen kaltgesättigter Allantoinlösung vor dem Kochen. Farbe und Spektrum des Ätherextraktes unterscheiden sich in nichts von dem bei Versuch 1 und 2 beobachteten.

Versuch 5 und 6. Wie 1 bzw. 2, jedoch mit Zusatz von je 5 ccm kaltgesättiger Allantoinlösung. Ätherextrakt braunrot, bei starker Konzentration Auslöschung des Spektrums bis auf einen Teil des Rot. Bei Verdünnung des Extraktes löst sich ein Streifen im Rot von der umgebenden Verdunkelung los.

Aus den beobachteten Tatsachen ergibt sich, daß die Probe für den Nachweis des Allantoins in physiologischen Flüssigkeiten nicht geeignet ist, da unter Umständen schon bei der leeren Probe deutliche Streifen auftreten; zumindest müßte jeder Probe eine leere Kontrollprobe mit genau gleichen Mengenverhältnissen angeschlossen werden, um Irrtümer zu verhüten. Übrigens ist auch die Empfindlichkeit der Probe recht gering (Versuch 3 und 4).

Auf die Reaktion mit Pepton und Schwefelsäure, die bei der Untersuchung des rein dargestellten Allantoins mehrfach erwähnt wurde, möchte ich nur ganz kurz eingehen. Wiechowski hat neuerdings gefunden, daß die Adamkiewiczsche Reaktion nicht allein mit Glyoxylsäure, sondern auch mit dem Diureid derselben, dem Allantoin (und übrigens noch mit einigen anderen Stoffen) positive Resultate gibt. Zudem machte O. Adler neuerdings darauf aufmerksam, daß bei der spektroskopischen Untersuchung der Adamkiewiczschen Reaktion — nur das Ergebnis der spektroskopischen Untersuchung kann für physiologische Flüssigkeiten wie Harn in Betracht kommen — der Zusatz eines Tropfens verdünnter Eisenchlorid- oder Platin-

chloridlösung das charakteristische breite Band viel schärfer zur Anschauung bringt.

Diese Verschärfung läßt sich nach Wiechowski auch mit Vorteil zum Nachweise geringer Mengen von Allantoin verwenden.

Im Harn selbst läßt sich die Reaktion nicht ausführen, wohl aber in schon gereinigten Allantoinfraktionen oder mit selbst kleinsten Mengen isolierter Allantoinkrystalle. Die Einführung dieser Farbenreaktion bedeutet meines Erachtens einen wesentlichen Fortschritt insofern, als der positive Ausfall — wenn auch durchaus nicht beweisend — doch wesentlich zur Charakterisierung des isolierten Stoffes beiträgt, der negative Ausfall jedoch die Anwesenheit von Allantoin unter den angeführten Umständen ausschließen läßt.

Zum Schluß sei mir gestattet, dem Vorstande der Klinik, Herrn Hofrat Professor Přibram, für die Überlassung des Materials und die stete Förderung dieser Arbeit meinen ergebenen Dank auszusprechen, ferner Herrn Assistenten Dr. O. Adler für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Literatur.

1. Wilhelm Wiechowski, diese Zeitschr. 19, 368, 1909.
2. Buniva und Vauquelin, Ann. de Chimie 33, 269, 1799.
3. Wöhler, Ann. d. Chem. u. Pharm. 70, 229, 1849.
4. Josef Feith, Doktordissertation, Bonn 1899.
5. Poduschka, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 44, 59, 1900.
6. Schloß, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 452, 1906.
7. Liebig, Poggendorfs Ann. d. Phys. u. Chem. 21, 34, 1831.
8. Frerichs und Städeler, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1854, 393.
9. Köhler, Zeitschr. f. ges. Naturw. 1857, 336.
10. Schottin, Arch. d. Heilkunde 1, 417, 1860.
11. Meißner, Zeitschr. f. rationelle Med. 1868, 31.
12. Huppert-Neubauer, S. 377 der Auflage 1898.
13. Wiechowski, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 109, 1907.
14. O. Loewi, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 44, 1, 1900.
15. H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. 3, 51, 1907.
16. Pfeiffer, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 324, 1907.
17. Th. Cohn, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 507, 1898.
18. Wiechowski, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 60, 185, 1908.
19. Schulze und Barbieri, Journ. f. prakt. Chem. 25, 145.
20. Schulze und Boßhard, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 420.

21. Richardson und Crampton, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 19, 1180, 1886.

22. E. v. Lippmann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 29, 2645, 1896.

23. Scurti und Perciabosco, Gaz. chim. Ital. 36, II, 626, 1906.

24. Schittenhelm und K. Wiener, Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 283, 1909.

25. Stadthagen, Virchows Archiv 109, 416, 1887.

26. Moscatelli, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 202, 1888.

27. Schiff, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 10, 774, 1877.

28. B. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1783 u. 1788, 1908.

29. C. Tollens, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 115, 1908.

30. I. A. Mandel und C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 148, 1908.

31. C. Neuberg, Erfahrungen über die Naphthoresorcinreaktion. Diese Zeitschr. 24, 436, 1910.

32. Otto Sittig, diese Zeitschr. 21, 14, 1909.

33. O. Adler, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 56, 207, 1907.

Über die Verteilung der reduzierenden Substanzen im Kaninchenblut.

Von

H. Lyttkens und J. Sandgren.

Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 8. Mai 1910.)

Aus den Mitteilungen von Rona und Michaelis[1]) und Hollinger[2]) geht hervor, daß entgegen der gewöhnlichen Annahme die Blutkörperchen von Hund und Mensch Traubenzucker, und zwar in ungefähr derselben Quantität wie Serum enthalten.

Da diese Tatsache eine große Bedeutung besitzt und zudem die widersprechenden Angaben zu eingehender Prüfung auffordern, haben wir auf Vorschlag Prof. Bangs Untersuchungen über die Verteilung der reduzierenden Stoffe im Kaninchenblut angestellt. Die Aufgabe war also, den Gehalt der Blutkörperchen und des Serums sowohl an Dextrose wie an den übrigen reduzierenden Stoffen unter verschiedenen Bedingungen festzustellen. Diese unsre Untersuchung gliedert sich an die frühere, aus dem hiesigen Institut von Andersson[3]) publizierte Mitteilung über die reduzierenden Stoffe im Vollblut an.

Was die Methodik anbetrifft, so wurde das Blut aus der Carotis der Kaninchen in einer 0,85%igen NaCl-Lösung, die mit 0,12% Natriumoxalatlösung versetzt war, aufgefangen. Es wurde 3 mal zentrifugiert (die letzten 2 Male mit reiner NaCl-Lösung). Die gesammelten Abgüsse wurden durch Kochen + Essigsäure enteiweißt und bis auf 25 bis 30 ccm konzentriert. In 10 ccm wurde der Zuckergehalt nach Bang bestimmt (die kleine in Lösung gebliebene Eiweißmenge schadet hierbei nicht). Die übrig gebliebene Lösung wurde vergoren und nachher titriert. (In einigen Fällen wurde die Lösung vor der Gärung erst verdünnt und nachdem wieder konzentriert.) Da es sich herausstellte, daß die ursprüngliche Lösung mit demselben Erfolg vergoren werden konnte, wurde in den meisten Versuchen die Gärung direkt mit der Lösung angestellt.

Die Blutkörperchen wurden in Wasser gelöst und teils nach der Alkoholmethode behandelt. Zuletzt wurde die alkoholische Lösung

[1]) Rona und Michaelis, diese Zeitschr. 16, 60, 1909; 18, 375, 1909.

[2]) Hollinger, diese Zeitschr. 17, 1, 1909.

[3]) Andersson, diese Zeitschr. 12, 1, 1908.

stark konzentriert, mit kolloidalem Eisenoxyd gereinigt (als Elektrolyt NaCl) und titriert. Die übrig gebliebene Lösung wurde vergoren und titriert. Teils wurden die aufgelösten Blutkörperchen unter Zusatz von Essigsäure aufgekocht, das Filtrat konzentriert und mit Eisen oder Kohle gereinigt. Die Kohlenmethode kam nur ausnahmsweise zur Verwendung, da hierbei viel NaCl gebildet wird, das eine starke Verdünnung der Lösung für die Gärung fordert.

Nach dem ersten Aderlaß folgte 30 Minuten später ein zweiter. Das Blut wurde auch jetzt in Körperchen und Serum getrennt, die beide auf Zucker u. a. reduzierende Stoffe untersucht wurden.

Versuche mit Normaltieren.

Die Ergebnisse dieser Versuche umfassen also die Verteilung der reduzierenden Substanzen im normalen Blut und bei der Aderlaßhyperglykämie. Sie sind in der umstehenden Tabelle zusammengestellt.

Aus der Tabelle I gehen mehrere Tatsachen hervor. Wir wollen zuerst die Ergebnisse des normalen Blutes besprechen. Hier können wir zuerst feststellen, daß die reduzierenden Stoffe ungleichmäßig zwischen Blutkörperchen und Serum verteilt sind, indem die Blutkörperchen eine durchschnittliche Totalreduktion von 0,07 bis 0,08 %, Serum dagegen 0,27 % aufweisen oder ca. 4 mal mehr. Es wurde hierbei überall angenommen, daß das Blutkörperchenvolum 375 ‰ des Blutes ausmachte. Weiter ist ersichtlich, daß die Totalreduktion bei den Blutkörperchen in den verschiedenen Versuchen recht erheblich variierte, nämlich von 0,041 % bis ausnahmsweise 0,22 %. (Es ist ganz ausgeschlossen, daß z. B. bei Versuch Nr. 4 mit 0,22 % Versuchsfehler vorliegen. Beim 2. Aderlaß wurde ein entsprechender Gehalt gefunden. Bei einem Adrenalinkaninchen wurde weiter über 0,3 % Totalreduktion bei den Blutkörperchen gefunden. Hier gaben 2 Titrationen dasselbe Resultat.) Diese Reduktion der Blutkörperchen entspricht aber keinem Traubenzucker, indem, wie Versuche Nr. 9, 10 und 13 lehren, die Reduktion nach der Gärung unverändert geblieben ist. Die unten zu besprechenden Phlorizinversuche haben dasselbe Resultat gegeben. Ebenso die Reduktion der Blutkörperchen nach dem Aderlasse. Hieraus läßt sich die Folgerung ziehen, daß die normalen Blutkörperchen des Kaninchens keine Dextrose enthalten. Folglich verhalten sich Kaninchenblut und Hundeblut in dieser Beziehung verschieden. Auf diesen Gegensatz sind schon Rona und

Michaelis (l. c.) aufmerksam geworden, indem sie ausdrücklich bemerken, daß in zwei Fällen keine rechtsdrehende Substanz in den Blutkörperchen des Kaninchens gefunden ist. Dagegen enthalten die Körperchen andere reduzierende Stoffe. Welche diese sind, bleibt unentschieden. Jedenfalls ist die Tollenssche Glucuronsäurereaktion schwach oder zweifelhaft.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Gewicht der Kaninchen g		Blutmenge g	Blutkörperchenreduktion vor Gärung %	Blutkörperchenreduktion nach Gärung %	Serumreduktion vor Gärung %	Serumreduktion nach Gärung %
1	1800	1. Aderlaß	15,7	0,071	—	—	—
		2. „	—	—	—	—	—
2	1500	1. „	15,1	0,070	—	—	—
		2. „	—	—	—	—	—
3	3900	1. „	21,5	0,064	—	—	—
		2. „	21,0	0,084	—	—	—
4	1900	1. „	21,6	0,220	—	0,330	—
		2. „	32,1	0,222	—	0,624	—
5	1100	1. „	25,9	0,043	—	0,300	—
		2. „	16,1	0,287	—	0,737	—
6	1700	1. „	11,1	0,120	—	0,241	—
		2. „	36,6	0,221	—	0,363	—
7	2400	1. „	10,6	0,061	—	0,260	—
		2. „	—	—	—	—	—
8	1700	1. „	27,5	0,071	—	0,221	—
		2. „	—	—	—	—	—
9	1300	1. „	25,7	0,088	0,085	0,242	0,034
		2. „	27,4	0,095	0,095	0,799	0,036
10	3300	1. „	35,0	0,041	0,041	0,236	0,042
		2. „	50,6	0,078	0,058	0,631	0,093
11	2300	1. „	20,0	0,075	—	0,308	0,032
		2. „	47,2	0,075	0,071	0,496	0,039
12	2200	1. „	39,1	—	—	—	—
		2. „	52,4	0,063	—	0,574	—
13	3900	1. „	24,7	0,112	0,114	0,280	0,070
		2. „	34,1	0,135	0,131	0,568	0,076

Die Totalreduktion des Serums ist ca. 0,27% (von 0,22 bis 0,30%), und die Differenzen sind hier nicht so groß wie bei den Blutkörperchen. Weiter geht aus den Versuchen Nr. 9, 10, 11 und 13 hervor, daß etwa 90% der Totalreduktion Traubenzucker entsprechen. Die Phlorizinversuche ergaben dasselbe Resultat. Von übrigen reduzierenden Substanzen ist die Glucuronsäure zu erwähnen. Die Tollenssche Reaktion

war überall stark. Die Glucuronsäure ist im Blute früher von P. Mayer[1]) nachgewiesen worden.

Im normalen Blut kommt also aller Traubenzucker im Serum vor. Der Traubenzuckergehalt ist weiter etwa 0,20%. Sehr wahrscheinlich kann er auch bis 0,30% steigen, ohne daß hierdurch notwendigerweise Glucosurie entsteht.

Auf das Gesamtblut übergeführt, lehren die Versuche, daß die sogenannte Restreduktion hauptsächlich der Reduktion der Blutkörperchen entspricht. Wenn weiter Serum 0,27% und die Körperchen 0,07 bis 0,08% Totalreduktion aufweisen, ist es klar, daß die Summe dieser beiden mehr als der gewöhnlichen Totalreduktion des Kaninchenblutes entspricht. Die folgende Tabelle kann hierüber näher unterrichten.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Blutmenge g	Blutkörperchen + Serumreduktion in mg	Totalreduktion auf Gesamtblut berechnet in %
4	21,6	62,37	0,28
5	25,9	52,74	0,20
6	11,1	21,71	0,19
7	10,6	20,08	0,19
8	27,5	45,31	0,16
9	25,7	46,35	0,18
10	35,0	56,94	0,16
11	20,0	44,13	0,22
13	24,7	53,60	0,22

Hier finden wir durchschnittlich 0,20% Totalreduktion gegen 0,10 bis 0,14% bei der Analyse des Gesamtblutes. (Sieht man von dem recht abnormen Versuch Nr. 4 ab, wird die Totalreduktion 0,18%). Zur Erklärung dieser Differenz kann man die Möglichkeit hervorheben, daß vielleicht etwas gebundener Zucker durch das Darstellungsverfahren freigemacht werden könnte. Diese Eventualität trifft jedenfalls nicht für die Blutkörperchen zu, indem in mehreren Versuchen (Nr. 1 bis 8) die Alkoholmethode mit Eisen verwendet wurde, dieselbe Methode, die für die Analyse des Gesamtblutes sonst oft gebraucht worden ist. Da nun weiter das Serum wesentlich nur Traubenzucker enthält, muß wahrscheinlich ein Teil desselben in gebundener Form zirkulieren. Zwar haben besonders Michaelis und Rona[2]) auf Grund von Dialyseversuchen angegeben, daß aller

[1]) P. Mayer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 518, 1901.
[2]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 14, 476, 1908.

Zucker frei in Serum vorkommt. Dagegen stehen aber die Beobachtungen von Lepine und Boulud[1]), daß durch Dialyse des frischen Blutes nur ein Teil diffundiert. Hammarsten[2]) hebt auch die Möglichkeit hervor, daß ein Teil des Zuckers an Eiweiß gebunden vorkommt. Hierüber näher unten.

Nach dem Aderlaß steigt bekanntlich der Blutzuckergehalt bedeutend. Unsere Versuche zeigen, daß sowohl für Blutkörperchen wie für Serum ein Ansteigen vorhanden ist (zweiter Aderlaß $^1/_2$ Stunde nach dem ersten). Bei den Blutkörperchen ist die durchschnittliche Totalreduktion jetzt 0,14%. (In einem Versuch, Nr. 5, sind die Ziffern von 0,043% beim ersten bis 0,287% beim zweiten Aderlaß. Diese Differenzen sind viel größer als sonst und können zum Verdacht eines Analysenfehlers Anlaß geben. Wir finden uns aber nicht berechtigt, den Versuch auszuschließen, da wir keinen solchen entdecken konnten. Dies um so weniger, als Versuch Nr. 6 0,12% bis 0,22% ergab. Ausnahmsweise kommt also ein beträchtliches Ansteigen der Totalreduktion vor.) Dieses Ansteigen entspricht aber, wie die Versuche Nr. 9, 10, 11 und 13 lehren, keineswegs einem Auftreten von Traubenzucker, da die Reduktion nach der Gärung unverändert geblieben ist. Die Reaktion auf Glucuronsäure war auch fortwährend schwach. Ganz übereinstimmend zeigen aber die Versuche eine Vermehrung der Reduktion, die also nicht dem Traubenzucker entspricht. Wir erinnern in dieser Beziehung an die Versuche Anderssons, in denen nach Aderlaß auch die Restreduktion vermehrt worden ist.

Die durchschnittliche Reduktion des Serums ist jetzt zu 0,60% gefunden. Hierbei kommt der wesentlichste Teil auf den Traubenzucker selbst, indem die durchschnittliche Restreduktion nach der Gärung 0,06% entspricht. Wie beim normalen Blut ist also auch nach dem Aderlasse gefunden worden, daß der gärungsfähige Zucker ausschließlich im Serum vorkommt, während die Restreduktion hauptsächlich von den Blutkörperchen herstammt.

Auch bei dieser Hyperglykämie entspricht keineswegs die Summe der Blutkörperchenreduktion und Serumreduktion auf Gesamtblut berechnet der gewöhnlich gefundenen von 0,26% bis 0,37%. Die Ergebnisse waren hier wie folgt:

[1]) Lepine und Boulud, Compt. rend. 143.

[2]) Hammersten, Lehrbuch, 7. Aufl., 1910, S. 253.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Blutmenge g	Reduktion von Blutkörperchen + Serum mg	Totalreduktion auf Gesamtblut in Proz. berechnet
4	32,1	151,73	0,47
5	16,1	89,70	0,55
6	36,6	113,89	0,31
9	27,4	146,69	0,53
10	50,6	216,85	0,40
11	47,2	159,51	0,34
13	34,1	138,74	0,41

Durchschnittlich 0,43%. Wir haben also auch bei dieser Hyperglykämie dieselbe Erscheinung wie beim normalen Blut.

Diese Tatsache, daß die Summe der Einzelreduktion von Blutkörperchen und Serum wahrscheinlich größer ist als die Totalreduktion, fordert eine besondere Verifikation. Der folgende Versuch Nr. 13 umfaßt eine solche Untersuchung. An einem Kaninchen, Gewicht 3900 g, wurden wie gewöhnlich 2 Aderlässe ausgeführt. Das Blut — ca. 45 und 50 ccm — wurde defibriniert, durch Gaze koliert und jedesmal in 2 Teile geteilt. In der einen Portion wurde die Totalreduktion bestimmt, in der zweiten die Reduktion der Blutkörperchen und des Serums. Die Ergebnisse sind in der Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

Versuch Nr.		Reduktion der Blutkörperch. %	Reduktion des Serums %	Reduktion von Blutkörperch. + Serum mg	Totalreduktion d. Blutkörperchen + Serum %	Totalreduktion des Vollblutes %	Differenz %
13.	1. Aderlaß	0,112	0,280	53,6	0,217	0,170	0,047
„	2. „	0,135	0,568	138,7	0,407	0,345	0,062

Hieraus ist ersichtlich, daß tatsächlich die Summe der Einzelreduktionen größer ist als die Totalreduktion des Vollblutes; Versuchsfehler liegen also nicht vor.

Die Titrationen waren sehr scharf, und die Übereinstimmung vor und nach der Gärung für die Blutkörperchen gibt einen guten Beleg für ihre Richtigkeit. Wir können aus diesen Versuchen mit Wahrscheinlichkeit folgern, daß ein Teil des Zuckers mit den Eiweißkörpern des Serums verbunden vor-

kommt, welcher Teil nicht durch Fällung mit Eisen oder Alkohol frei gemacht werden kann, sondern nur bei Koagulation durch Kochen (Enteiweißung mit Eisen oder Alkohol lieferte übereinstimmende Werte.[1])

Der normale Gehalt des Serums an Traubenzucker ist also etwa 0,2%. Bei der Hyperglykämie nach Aderlaß steigt er bis durchschnittlich etwa 0,5%. Die Tabelle V liefert hierfür eine Übersicht. Man bemerkt auch hier, daß die Dextrose ausschließlich im Serum vorkommt, da die absoluten Zuckerwerte für Vollblut und Serum überall identisch sind.

Tabelle V.

Versuch Nr.		1. Aderlaß				2. Aderlaß			
		Restreduktion		Dextrose		Restreduktion		Dextrose	
		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
9	Blutkörperchen + Serum . .	13,65	0,053	33,70	0,131	15,99	0,058	130,70	0,472
	Serum	5,46	0,034	33,41	0,208	6,16	0,036	130,70	0,763
10	Blutkörperchen + Serum . .	14,55	0,042	42,39	0,119	40,48	0,080	176,37	0,320
	Serum	9,19	0,042	42,39	0,194	29,41	0,093	170,14	0,537
11	Blutkörperchen + Serum . .	—	—	—	—	24.07	0,051	135,53	0,287
	Serum	4,00	0,032	34,50	0,276	11,51	0,039	134,81	0,457
13	Blutkörperchen + Serum . .	21,35	0,086	32,25	0,131	32,95	0,097	105,79	0,310
	Serum	10,81	0,070	32,25	0,210	16,20	0,076	104,86	0,492

Phlorizinversuche.

Bei der Phlorizinglucosurie besteht, wie besonders aus Erlandsens[2]) Untersuchungen hervorgeht, ein vermehrtes Eliminationsvermögen für Traubenzucker durch die Niere, indem eine entsprechende Zuckermenge in der Leber neugebildet wird. In den folgenden Versuchen wurden 0,75 g Phlorizin in 15 ccm 1%iger Sodalösung intraperitoneal und subcutan eingespritzt. 1 bzw. 2 Stunden später wurde der 1. Aderlaß vorgenommen und ½ Stunde später der zweite. Der Harn, nach 1 Stunde untersucht, zeigte eine starke Reduktion. Die Glucuronsäurereaktion war stark positiv.

[1]) Bang, Lyttkens und Sandgren, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 497, 1910.

[2]) Erlandsen, diese Zeitschr. 23, 329, 1910 und 24, 1, 1910.

Tabelle VI.

Versuch Nr.	Gewicht der Kaninchen g		Blutmenge g	Blutkörperchenreduktion vor Gärung %	Blutkörperchenreduktion nach Gärung %	Serumreduktion vor Gärung %	Serumreduktion nach Gärung %
14	2200	1. Aderlaß	33,4	0,073	0,070	0,247	0,047
		2. „	47,4	0,079	0,074	0,754	—
15	1900	1. „	36,6	0,082	0,078	0,223	0,040
		2. „	44,6	0,078	0,073	0,588	0,045

Wie ersichtlich, findet man bei den phlorizinvergifteten Kaninchen dieselbe Verteilung der reduzierenden Stoffe wie bei den Normaltieren. Die absoluten Mengen sind auch dieselben. Dagegen findet man entgegen Erlandsens Befunde bei dem 2. Aderlasse ein beträchtliches Ansteigen der Totalreduktion und insbesondere des Traubenzuckers im Serum. Unsere Kaninchen verhielten sich also gegenüber Aderlaß wie Normaltiere. Diese Befunde können aber Erlandsens Ergebnisse nicht umstürzen. Denn erstens ist die Aderlaßhyperglykämie eine konstante Erscheinung, und wenn man nach Phlorizinvergiftung ein Ausbleiben derselben konstatieren kann, ist dies beweisend. Zweitens haben wir größere Blutmengen als Erlandsen entnommen. Weiter haben wir die Versuchstiere nicht vor Temperaturerniedrigung geschützt. In einem Versuche wurde das Phlorizin intraperitoneal injiziert. Das Phlorizinpräparat war mehrere Jahre alt und in Lösung stark gelb gefärbt.

Adrenalinversuche.

Schließlich haben wir ein paar Versuche mit Adrenalinvergiftung ausgeführt. Die Tiere bekamen 2 mg Adrenalin subcutan. 1 Stunde später wurde der 1. und nach noch $^1/_2$ Stunde der 2. Aderlaß vorgenommen.

Tabelle VII.

Versuch Nr.	Gewicht der Kaninchen g		Blutmenge g	Blutkörperchenreduktion vor Gärung %	Blutkörperchenreduktion nach Gärung %	Serumreduktion vor Gärung %	Serumreduktion nach Gärung %
16	2000	1. Aderlaß	20,0	0,325	0,300	0,775	0,104
		2. „	34,2	0,101	0,100	0,761	0,066
17	2000	1. „	14,8	0,083	—	0,418	0,077
		2. „	27,5	0,133	0,112	0,569	0,078

Nach Adrenalinvergiftung findet also ein bedeutendes Ansteigen des Traubenzuckers im Serum statt, das nach dem 1. Aderlaß persistiert. Auch hier enthalten die Blutkörperchen keinen Traubenzucker, trotzdem sie in dem zuckerreichen Serum längere Zeit aufgeschwemmt sind. Diese Ergebnisse stehen im schroffen Gegensatz zu den Versuchen von Michaelis und Rona, in denen die Blutkörperchen von Hund bei Hyperglykämie mehr Zucker aufnehmen. Recht sonderbar ist bei Versuch Nr. 16 die große Reduktion der Blutkörperchen beim 1. Aderlaß. Daß Versuchsfehler nicht vorliegen, zeigt die Reduktion nach der Gärung. Die Reduktion entspricht also keinem Traubenzucker. Bemerkenswert ist weiter, daß beim 2. Aderlaß die Blutkörperchenreduktion auf ca. $^1/_3$ gesunken ist. Auch hier bleibt die Reduktion nach der Gärung unverändert.

Fassen wir schließlich die Ergebnisse unserer Untersuchung zusammen, so hat sich herausgestellt:

1. Sowohl die Blutkörperchen wie das Serum enthalten reduzierende Stoffe.

2. Bei den Blutkörperchen ist deren Menge 0,07 bis 0,08%, beim Serum 0,27%, als Dextrose berechnet.

3. Diese Reduktion entspricht bei den Blutkörperchen keinem Traubenzucker.

4. Aller Zucker kommt im Serum vor. Der Gehalt ist im Serum ca. 0,22%.

5. Nach Aderlaß steigt die Reduktion, sowohl bei den Blutkörperchen wie im Serum.

6. Bei den Blutkörperchen erreicht die Reduktion Werte bis 0,14%, im Serum bis zu 0,60%.

7. Auch nach dem Aderlaß kommt die ganze Zuckermenge im Serum vor. Gehalt = 0,54%.

8. Nach Vergiftung mit Phlorizin ist die Verteilung der reduzierenden Stoffe wie im Normalblut;

9. Bei Adrenalinvergiftung ist die Verteilung etwa wie beim Aderlaßblute.

10. Ein Teil des Zuckers existiert wahrscheinlich im zirkulierenden Blute in gebundener Form.

Beitrag zur Physiologie des Winterschlafes.

Von

Felix Reach.

(Aus dem physiologischen Institut der k. k. Hochschule für Bodenkultur in Wien.)

(Eingegangen am 9. Mai 1910.)

Der Stoffwechsel der Winterschläfer ist zwar schon wiederholt Gegenstand von Untersuchungen gewesen, dennoch erschien es nicht aussichtslos, nochmals an einer größeren Anzahl von Fledermäusen Studien in dieser Richtung auszuführen. Einerseits versprach die Verwendung neuerer Methoden Resultate, die die früheren zum Teil weit zurückliegenden Untersuchungen über diesen Gegenstand nicht ergeben konnten; andererseits besitzen wir überhaupt nicht allzu viele Resultate von Analysen, die sich auf Serien ganzer Säugetiere beziehen, und es scheint, daß derartige Untersuchungen berufen sind, nähere Aufschlüsse über die Zusammensetzung der Gesamtkörper und deren Veränderungen unter verschiedenen Umständen zu geben. Im vorliegenden Falle wurde insbesondere der Glykogen- und Fettgehalt der Tiere untersucht, und ferner wurden einige Konstanten der Fettsäuren vor und nach dem Winterschlafe bestimmt.

Wir wissen noch nichts darüber, ob der Organismus die verschiedenen Fettsäuren in gleicher Weise anzugreifen befähigt ist. A priori wäre es beispielsweise denkbar, daß im Hungerzustande die ungesättigten Fettsäuren schneller zerfallen als die gesättigten; das müßte sich bei einer Untersuchung des Gesamtfettes des hungernden Tieres durch eine Herabsetzung der Jodzahl ausdrücken. Wenn vorzugsweise die Fettsäuren mit kleinerem Molekül verbrannt würden, oder wenn die höheren Fettsäuren zunächst in niedere sich umwandelten, so könnte das auf die Verseifungszahl einwirken. Untersuchungen über derartige durch

den Hunger hervorgerufene Veränderungen scheinen noch gar nicht angestellt worden zu sein, wenigstens gelang es mir nicht, eine Angabe darüber in der Literatur zu finden. Im Winterschlafe ist der Hunger mit verlangsamtem Stoffwechsel verbunden; in diesem Zustande befindliche Tiere schienen daher für derartige Studien besonders geeignet; hier wäre es auch am ehesten zu erwarten, intermediäre Stoffwechselprodukte anzutreffen. Die durch mannigfache Gaswechseluntersuchungen festgestellte Tatsache, daß der respiratorische Quotient im tiefen Winterschlafe bedeutend unter den des Fettes sinkt, daß also während des Winterschlafes O aufgespeichert wird, läßt es möglich erscheinen, daß besonders O-reiche Zwischenprodukte der Verbrennung sich bei diesem Zustande im Körper anhäufen. Zur speziellen Erklärung dieses niedrigen respiratorischen Quotienten nahm man vielfach eine Bildung von Glykogen aus Fett an. Wenn auch mehrere Untersuchungen der letzten Jahre dieser Hypothese widersprachen, war es doch zweckmäßig, sie nochmals durch die Untersuchungen einer Reihe ganzer Tiere zu prüfen. Ein anderes relativ O-reiches Zwischenprodukt hat kürzlich Nagai[1]) bei Winterschläfern in geringer Menge gefunden, nämlich die Milchsäure. Muttersubstanzen dieser Oxysäure konnten sowohl die Eiweißkörper als auch die Fette sein. Es war immerhin die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß die O-Speicherung wenigstens teilweise am Fettmolekül stattfände. Für den Fall, daß diese Speicherung in der Form einer Hydroxylgruppe stattfände, bot sich zu ihrer Prüfung eine einfache Methode in der Bestimmung der Acetylzahl der Fettsäuren.

Gang der Untersuchung. Die Fledermäuse wurden in 2 Serien ins Laboratorium gebracht. Die 1. Serie von 10 Tieren wurde sofort nach ihrer Einbringung am 30. X. in Arbeit genommen. Um diese Zeit hatte die kältere Witterung gerade erst begonnen; die Fledermäuse standen also am Anfange der Schlafperiode. Die 2. Serie, 12 Tiere, blieb zirka 6 Tage im geheizten Laboratorium und wurde am 8. XI. in Arbeit genommen. Bis zu diesem Tage erhielten sie Mehlwürmer, doch wurde niemals eine der Fledermäuse beim Fressen angetroffen, so daß es fraglich ist, ob sie während dieser 6 Tage Nahrung zu sich nahmen. Die Untersuchung begann bei jeder Serie damit, daß am 1. Tage jedes Tier einzeln gewogen wurde. Mit einem Teil der Tiere von jeder Serie wurde noch am selben Tage die Analyse begonnen, und zwar wurden teils einzelne Tiere, teils Gruppen

[1]) Nagai, Zeitschr. f. allg. Physiol. 9, 243, 1909.

analysiert. Die zum Winterschlaf bestimmten Tiere wurden einzeln in kleine Holz- oder Pappkästchen gegeben. Jedes Kästchen war mit Luftlöchern versehen und trug die Protokollnummer des betreffenden Tieres. Ein durch den obersten Teil des Kästchens ziehender Draht bot den Tieren Gelegenheit, sich mit den hinteren Extremitäten anzuhängen und ihre gewohnte Schlafstellung mit nach unten hängendem Kopfe einzunehmen. In der Tat wurden die überlebenden Tiere am Schlusse der Schlafperiode in dieser Stellung aufgefunden. Am 4. I. wurden sämtliche Kästchen aus dem kühlen Raume, in dem sie verwahrt waren, hervorgeholt. Der Winterschlaf hatte mithin ungefähr 2 Monate, also nur einen Teil der natürlichen Schlafzeit, gedauert. Von den 16 Tieren wurden 2 tot aufgefunden; die übrigen wurden wieder einzeln abgewogen und, in Gruppen vereinigt, analysiert. Die ganzen Analysen beziehen sich also auf 20 Tiere, von denen 7 vor und 13 nach dem Schlafe analysiert wurden.

Ein Schlaftier und ein Wachtier dienten zur N-Bestimmung. Die hierzu verwendeten beiden Tiere hatten nahezu das gleiche Anfangsgewicht. Sie wurden für eine Weile in ein Gefäß gesteckt, in dem sich ein mit Äther getränkter Wattebausch befand. Nachdem sie vollständig regungslos geworden waren, wurden sie zunächst mit der Schere in Stücke geteilt und hierauf mit dem Wiegemesser in einen gleichmäßigen Brei zerschnitten. Von diesem Brei diente je zirka 1 g zu einer N-Bestimmung. Zur genauen Abwägung dieser Menge wurde die Masse in ein gewogenes Stanniolblättchen gehüllt und im Wägegläschen auf die Wage gebracht. In dieser Hülle wurde es dann in den Kjeldahl-Kolben geworfen.

Die anderen Tiere dienten zur Glykogen- und Fettbestimmung. Bei einem Teile der Schlaf- wie der Kontrolltiere wurden die Lebern herausgenommen und jedesmal alle zusammen verarbeitet. Jedes einzelne Tier wurde durch Eintauchen in siedendes Wasser getötet, hierauf in Stücke geschnitten und mit der entsprechenden Menge 60%iger Kalilauge nach den von Pflüger[1]) für die Glykogenbestimmung gegebenen Vorschriften erhitzt. Die Glykogenbestimmung, die, wie erwähnt, nach Pflüger eingeleitet wurde, wurde jedoch durch Titration nach Bang[2]) zu Ende geführt. Zu diesem Zwecke wurde nach dem Invertieren neutralisiert, mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt, filtriert, der krystallinische Niederschlag mit Alkohol gewaschen, der Alkohol auf dem Wasserbade verjagt, die gesamte Flüssigkeit auf ein kleines Volumen (15 bis 50 ccm) gebracht und hiervon je 10 ccm zur Titration verwendet.

Das Filtrat von der Glykogenfällung durch Alkohol, mit der Waschflüssigkeit vereinigt, enthielt die gesamten Fettsäuren in Form von Seifen. Nach Einengung auf dem Wasserbade wurde die ganze Flüssigkeit in jedem einzelnen Falle zur Entfernung des „Unverseifbaren" mit Petroläther geschüttelt. [Nur in einem Falle wurde erst später das „Unverseifbare" separat

[1]) Grube in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden.
[2]) Diese Zeitschr. 2.

bestimmt[1]) und in Rechnung gesetzt.] Hierauf wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und abermals wiederholt mit Petroläther kräftig ausgeschüttelt und nach dem Absetzen die Flüssigkeiten getrennt. (Die Prozeduren des Ausschüttelns und Absetzenlassens dauerten mehrere Tage.) Der Petroläther wurde abdestilliert und der Rückstand abermals mit Petroläther aufgenommen, in gewogene Kölbchen filtriert, und die Filter mit Petroläther nachgewaschen. Die größere Menge des Petroläthers wurde zunächst auf dem Wasserbade verjagt und hierauf die Substanz in ein Bad von gesättigter Kaliumcarbonatlösung (Siedepunkt 135°) gebracht und in einem Strome von trockenem Kohlendioxyd die Reste des Petroläthers und etwaigen Wassers verjagt. Nachdem nahezu Gewichtskonstanz erreicht war, wurden einzelne Portionen zur Bestimmung der Neutralisationszahl der Fettsäuren (entsprechend der Verseifungszahl der Fette) der Jodzahl und der Acetylzahl verwendet. Zur Bestimmung der Jodzahl diente das Verfahren von Hübl. Der Titer der Natriumthiosulfatlösung wurde mittels Kaliumjodat gestellt. Die Bestimmung der Acetylzahl geschah nach Lewkowitschs Destillationsverfahren.

Über das Körpergewicht der einzelnen Tiere und seine Abnahme während des Winterschlafes gibt die Tabelle I Aufschluß, die gleichzeitig zur Übersicht über die Gruppierung der Tiere im Versuche dient. Wir ersehen aus ihr zunächst, daß schon das Anfangsgewicht der Tiere innerhalb ziemlich weiter Grenzen schwankt (21,36 bis 33,46 g). Individuelle Unterschiede machen sich auch hinsichtlich des Gewichtsverlustes durch den Winterschlaf geltend. Besonders aus der Reihe fallend ist der Gewichtsverlust der Tiere Nr. 5 und 9, der, pro 100 g Anfangsgewicht und Tag berechnet, 0,458 und 0,416 g beträgt. Diese zwei Tiere wurden deswegen in einer Gruppe vereinigt analysiert. Ähnlich zeichnen sich zwei Tiere (Nr. 10 und 19) durch besonders geringen Gewichtsverlust aus (0,185 und 0,197 g). Diese beiden Tiere gehören jedoch zwei verschiedenen Serien an (schliefen verschieden lange), weshalb sie bei den Analysen nicht vereinigt wurden.

Im Durchschnitte beträgt der Verlust pro 100 g und Tag 0,263 g. Wenn wir diesen Gewichtsverlust mit den von anderen Autoren gefundenen Zahlen vergleichen wollen, so müssen wir uns vor Augen halten, daß diese Größe in hohem Maße von der Dauer des Winterschlafes abhängt. Die Körpergewichte eines winterschlafenden Tieres ergeben eine Kurve, die anfangs steiler als später abfällt, wie beispielsweise Polimantis[2]) Unter-

[1]) Röhmann in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden.

[2]) Polimanti, Arch. ital. d. Biol. 42, 1905.

Tabelle I.

Körpergewichte.

Nr.	Dauer des Winterschlafes	Anf.-Gew.	End-Gew.	Verlust			Anmerkung
				absolut	pro 100 g	pro 100 g u. Tag	
	Tage	g	g	g	g	g	
1	0	28,08	—	—	—		Nr. 1, 2, 3 einzeln zur Glykogen- und Fettsäurebestimmung verarbeitet.
2	0	28,30	—	—	—		
3	0	28,87	—	—	—		
4	66	28,50	24,33	4,17	14,6	0,222	Nr. 4, 7, 8, 10 zusammen zur Glykogen- und Fettsäurebestimmung verarbeitet.
5	66	27,74	19,07	8,67	30,1	0,458	Nr. 5, 9 zusammen zur Glykogen- u. Fettsäurebestimm. verarbeitet.
6	66	33,45	—	—	—	—	Tot aufgefunden.
7	66	29,38	25,00	4,38	14,8	0,226	Bei Nr. 1—5 und 7—10 wurden die Lebern entfernt und für sich wie die ganzen Tiere verarbeitet. Die Lebern von Nr. 1—3 wurden dabei zusammengenommen, ebenso die übrigen Lebern.
8	66	28,11	23,67	4,44	15,7	0,238	
9	66	31,97	23,20	8,77	27,3	0,416	
10	66	32,23	28,34	3,89	12,0	0,185	
11	0	27,29	—	—	—	—	Zur N-Bestimmung verwendet.
12	58	30,85	25,69	5,16	16,8	0,289	Nr. 12, 17, 18 zusammen zur Glykogen- und Fettsäurebestimmung verarbeitet.
13	58	23,11	—	—	—	—	Tot aufgefunden.
14	58	26,19	22,60	3,59	13,7	0,237	Nr. 14, 15, 19 zusammen zur Glykogen- und Fettsäurebestimmung verarbeitet.
15	58	27,77	23,67	4,10	14,8	0,257	
16	58	27,27	23,77	3,50	12,6	0,218	Nr. 16. Zur N-Bestimmung verwendet.
17	58	28,57	24,82	3,75	13,1	0,225	
18	58	29,29	25,60	3,69	12,6	0,217	
19	58	21,36	18,90	2,46	11,5	0,197	
20	0	27,59	—	—	—	—	Nr. 20, 21, 22 zusammen zur Glykogen- und Fettsäurebestimmung verarbeitet.
21	0	31,17	—	—	—	—	
22	0	24,69	—	—	—	—	
Summe	(Nur auf die 13 überlebenden Schlaftiere bezüglich)	369,23	308,66	60,57	—	—	
Durchschnitt		28,40	23,74	4,66	16,4	0,263	

suchungen ergeben. Bei Vallentins[1]) Murmeltieren schwankt der Gewichtsverlust ebenfalls pro 100 g und Tag um 0,2 g. Weinland und Riehl[2]) fanden diese Größe bei Murmeltieren bei 92tägigem Winterschlaf zu 0,23 g, bei 29tägigem zu 0,24 g und bei 26tägigem zu 0,35 g. Nagais Murmeltier A schlief

[1]) Zitiert nach Polimanti a. a. O.

[2]) Weinland und Riehl, Zeitschr. f. Biol. 49, 1907 u. 50, 1908.

74 Tage, also ungefähr ebenso lange wie unsere Fledermäuse, und es betrug der Verlust pro 100 g und Tag 0,26 g, also ebenso viel wie bei unseren Fledermäusen. Ein Siebenschläfer desselben Autors, der nur 19 Tage schlief, verlor (in derselben Weise umgerechnet) 0,42 g. Als die hier berichteten Versuche bereits im Gange waren, erschienen zwei Arbeiten von Hári[1]), die sich mit dem Stoffwechsel der Fledermäuse im Wachzustande und im Winterschlafe befaßten. Eine Fledermaus, die 85 Tage schlief, verlor pro 100 g und Tag 0,079 g. Eine zweite, die 48 Tage schlief, 0,22 g; dabei ist aber zu bemerken, daß Háris Anfangswert im Dezember erhoben wurde, also mitten im Winterschlafe, weshalb es begreiflich ist, daß seine Zahlen auffallend niedrig sind. An nicht winterschlafenden, aber hungernden Fledermäusen erhielt Hári für den Gewichtsverlust pro 100 g und Tag 3,3 resp. 2,6 g. Er bemerkt hierzu, daß der Stoffwechsel der Fledermäuse ein auffallend geringer ist, und es sei hier nach ihm zitiert, daß Böthlingks Mäuse bei einem Körpergewicht von 21 bis 26 g pro 100 g und Tag 6 bis 10 g verloren; bei größeren Tieren ist der Gewichtsverlust wieder geringer. Es geht überdies aus Háris Versuchen hervor, daß Fledermäuse sowohl durch sinkende Temperatur als auch durch einige Tage andauernden Hunger in einen Zustand besonders stark herabgesetzten Stoffwechsels verfallen, der offenbar als Übergang zum Winterschlafe anzusehen ist. Es empfiehlt sich daher wohl, die von den winterschlafenden Tieren gewonnenen Zahlen hauptsächlich mit solchen, die von Tieren anderer Art herrühren, zu vergleichen. Es sei nur noch hervorgehoben, daß unsere Tabelle keinen Parallelismus zwischen dem Anfangsgewichte und dem relativen Gewichtsverlust zeigt. Das schwerste der Tiere, Nr. 6, überlebte den Winterschlaf überhaupt nicht. Von den beiden Tieren, die besonders viel von ihrem Körpergewicht verloren, war das eine (Nr. 9) das drittschwerste, das andere (Nr. 5) gehörte zu den mittelschweren. Von den zwei Tieren mit auffallend geringem Verluste ist das eine (Nr. 19) das leichteste, das andere (Nr. 10) mit dem geringsten überhaupt beobachteten Gewichtsverlust, ist das zweitschwerste, also das schwerste von den überlebenden.

---

[1]) Hári, Pflügers Archiv 130, 90 u. 112, 1909.

Von den Ergebnissen der chemischen Analyse seien zuerst die den N-Gehalt der Tiere betreffenden mitgeteilt. Es müssen jedoch hier einige Bemerkungen vorausgeschickt werden. Es ist von Koch[1]) bezweifelt worden, ob die Fledermäuse während des Winterschlafes überhaupt Harn und Kot absetzen. Die geringen Mengen von Exkrementen, die man bei winterschlafenden Fledermäusen findet, können aus der kurzen Zeit vor dem Einschlafen stammen. Von den viel beobachteten Murmeltieren wissen wir, daß sie wiederholt aufwachen, Harn und Kot entleeren, um dann wieder einzuschlafen. Es sistiert also während des eigentlichen Schlafes nur die Ausstoßung, nicht die Produktion der Exkremente. Damit stimmt es für die Fledermäuse, daß Koenink[2]) die Harnblase der im Schlafe getöteten Tiere stets stark gefüllt fand. Unsere Tiere machten sich während der Schlafperiode einmal durch lautes Zwitschern bemerkbar. Sie schliefen also nicht ununterbrochen. Vor der Tötung wachten die Tiere bei den Vorbereitungen zur Wägung für kurze Zeit auf. Es dürfte daher berechtigt sein, die Differenz im Gesamtstickstoff der beiden daraufhin untersuchten, zu Beginn der Schlafperiode fast genau gleich schweren Tiere, auf N-Ausscheidung und auf Proteinzersetzung zu beziehen. Es steht jedoch die Bestimmung dieser Größe als Differenz zwischen zwei viel größeren Werten der direkten Untersuchung des ausgeschiedenen N jedenfalls nach. Dazu kommt noch dadurch eine gewisse Unsicherheit, daß vor und nach der Schlafperiode nur je ein Tier untersucht wurde.

Der N-Gehalt des vor dem Schlafe untersuchten Tieres betrug 3,61 %; die nach dem 58tägigen Schlafe analysierte Fledermaus war nunmehr relativ N-reicher, sie enthielt 4,00 % N. Auf 100 g Anfangsgewicht bezogen, ergaben sich jedoch nunmehr nur 3,48 g N. Wir dürfen also rechnen, daß pro 100 g Tier 0,13 g N oder pro 100 g und Tag 0,00244 g ausgeschieden wurden. Zum Vergleiche seien einige Werte von Hári und Nagai herangezogen. Háris Fledermaus I schied pro 100 g und Tag 0,00113 g, Fledermaus II 0,00153 g und drei weitere Fledermäuse verloren 0,00267 g. Bei Nagais Murmeltier war die betreffende Größe im Durchschnitte 0,00255 g. Nagai hat seine Werte mit den an wachenden Hungermurmeltieren verglichen und kommt zu dem Schlusse, daß die N-Ausscheidung im Schlafe nur auf $^1/_{10}$ des Wachwertes, die CO_2-Ausscheidung aber auf $^1/_{26}$ absinkt. Er schließt daraus, daß der „Baustoffwechsel" im Winterschlafe weniger absinkt als der „Betriebsstoffwechsel". Auch Háris und die Werte dieser Versuche zeigen eine relativ nicht unbedeutende N-Abgabe, die überdies von der von Nagai beobachteten keineswegs stark differiert. Es sprechen also auch die Ergebnisse dafür, daß der Stickstoff des zersetzten Proteins nicht zurückgehalten wurde. Im übrigen können wir uns hinsichtlich der N-Bilanz Nagai anschließen, auf dessen Ausführungen[3]) hier verwiesen sei.

[1]) Koch, zitiert nach Koeninck.

[2]) Koeninck, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1899, 389.

[3]) Nagai, a. a. O. S. 341.

Tabelle II.
Glykogen und Fett.

Nummer der Tiere	Gewicht		Glykogen				Fettsäuren			
	Anfangs-Gew.	End-Gew.	Im ganzen	pro Tier	pro 100 g Anf-Gew.	pro 100 g End-Gew.	Im ganzen	pro Tier	pro 100 g Anf.-Gew.	pro 100 g End-Gew.
	g	g	mg	mg	mg	mg	g	g	g	g
1	(28,08)	—	57.9	57,9	200	—	—	—	—	—
2	28,30	—	43,8	43,8	154	—	6,942	6,94	24,7	—
3	28,87	—	53,2	53,2	184	—	6,505	6,505	22,0	—
20, 21, 22	83,45	—	134,5	44,8	162	—	14,04	4,68	16,8	—
Summe	168,70	—	289,4			—				
	(140,62)	—					27,48			
Mittel	28,12	—	—	48,23	171	—		5,46		
4, 7, 8, 10	118,22	101,34	133,6	44,5	113	132	15,24	3,81	12.9	15,0
5, 9	59,71	42,27	52,8	26,4	88	125	3,21	1,605	5,4	7,6
12, 17, 18	88,71	76,11	104,2	34,7	118	137	12,92	4,31	14,6	17,0
14, 15, 19	75,32	65,17	111,8	37,3	148	172	7,69	2,56	10,2	11,8
Summe	341,96	284,89	402,5				39,06			
Mittel	28,497	23,74		33,5	117	138		3,255	11,4	13,7

Über den Gehalt der Tierkörper an Glykogen und Fettsäuren gibt Tabelle II Aufschluß. (In jenen Fällen, wo die Lebern herausgenommen und zusammen analysiert wurden, ist das Resultat der Analyse nach der Anzahl der Tiere repartiert und zu dem Restwerte hinzugerechnet. Die geringe Menge des in der Leber gefundenen Glykogens und Fettes rechtfertigt dieses Verfahren. Die Fettbestimmung von Tier Nr. 1 ging verloren.)

Was zunächst den Glykogengehalt der Tiere vor dem Winterschlafe anlangt, so zeigte sich, daß im Mittel der 6 Tiere auf 100 g 0,171 g Glykogen (Zuckerwert) entfallen. Die Vermutung Nagais, „daß der Winterschläfer . . . in seinem Körperdepot jedenfalls maximale Mengen von Glykogen besitzen muß, ehe der Schlaf beginnt", hat sich in diesen Versuchen also nicht bestätigt, denn die gefundenen Zahlen sind keineswegs maximale.

Von besonderem Interesse dürfte die Frage sein, wie sich der Glykogengehalt während des Winterschlafes ändert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß während des Winterschlafes Glykogen aus Fett gebildet werde. Diese Annahme sollte es, wie erwähnt, erklären, daß der respiratorische Quo-

tient oft kleiner gefunden wurde, als der Fettverbrennung entspräche, daß also jedenfalls eine Speicherung von Sauerstoff stattfindet. In neuerer Zeit wurde dieser Anschauung von der Glykogenbildung wiederholt widersprochen. Doch ist das vorliegende Tatsachenmaterial noch kein übermäßig großes, insbesondere fehlt es an Reihenversuchen, die auch den Anfangsgehalt der Tiere an Glykogen genügend feststellen. Nagai hat aber ohne Zweifel recht, wenn er darauf hinweist, daß das Fassungsvermögen des Tierkörpers für Glykogen kein so großes ist, als daß Glykogenbildung aus Fett, auch wenn sie stattfände, allein imstande wäre, den niedrigen respiratorischen Quotienten zu erklären. Weinland und Riehl[1]) haben 3 Murmeltiere auf ihren Glykogengehalt untersucht und stellen ihre Ergebnisse mit fünf teils von Voit und teils von Külz untersuchten Fällen zusammen. Es handelt sich also hier um acht von verschiedenen Autoren, nach zum Teil verschiedenen Methoden, zu sehr verschiedenen Zeiten untersuchte Tiere.

Weinland und Riehl kommen zu dem Schlusse, daß der absolute Glykogengehalt während des Winterschlafes konstant bleibe, daß sich jedoch das Glykogen in der Leber anhäufe. Hári bestimmte bei 13 Fledermäusen, die teils gehungert, teils verschieden lange oder nicht geschlafen hatten, in Gruppen vereinigt oder einzeln, das Glykogen. Seine Werte zeigen untereinander sehr große Verschiedenheiten, er konnte aus ihnen aber doch den Schluß ziehen, daß eine Glykogenansammlung in der winterschlafenden Fledermaus nicht stattfindet.

Unsere Tabelle II zeigt nun sehr deutlich, daß der Glykogengehalt der Schlaftiere kleiner war als der der Kontrolltiere. Freilich machen sich auch hier die individuellen Unterschiede geltend, wenn sie auch nicht so groß sind wie bei Hári. Der Maximalwert bei den Schlaftieren beträgt 0,148 g Glykogen pro 100 g Anfangsgewicht und ist freilich fast ebenso groß wie der Minimalwert bei den Kontrolltieren: 0,154. Diese Ähnlichkeit gilt jedoch nur für die extremen Größen. Der Maximalwert bei den Kontrolltieren beträgt 0,200 und der Minimalwert bei den Schlaftieren 0,088. Auch in den Mittelwerten drückt sich die Differenz noch deutlich aus, indem auf

[1]) Weinland und Riehl, Zeitschr. f. Biol. 50, 80, 1908.

100 g Anfangsgewicht bei den Kontrolltieren 0,171 und bei den Schlaftieren 0,117 g Glykogen (Zuckerwert) entfallen. Wir können also annehmen, daß die Abnahme des Glykogens 31,5% des Gesamtgehaltes betrug. Die Lebern enthielten im Durchschnitte pro Tier vor dem Winterschlafe 0,0046 g und nach dem Winterschlafe 0,0063 g, oder auf 100 g Anfangsgewicht des Tieres umgerechnet vor dem Winterschlaf 0,016 und nachher 0,021 g. Die Glykogenbestimmung in der geringen Lebermasse ist sicher mit einem größeren Fehler behaftet als die Bestimmung bei den ganzen Tieren; trotzdem darf man die hier mitgeteilten Zahlen als eine Bestätigung des erwähnten Befundes von Weinland und Riehl ansehen. Im ganzen zeigen also unsere Versuche in Übereinstimmung mit denen von Weinland und Riehl und Hári, daß eine Glykogenvermehrung im ganzen Körper nicht stattfindet. Hingegen können wir nicht bestätigen, daß der Glykogengehalt konstant bleibt. Seine relative Abnahme (d. h. die in Prozenten der ursprünglich vorhandenen Menge ausgedrückte Abnahme) ist zwar, wie wir hier gleich vorwegnehmen wollen, geringer, als die des Fettes, aber doch von derselben Größenordnung. Es beträgt nämlich die Abnahme an Glykogen 31,5% und die des Fettes 41,5%. Hingegen bestätigen unsere Versuche wiederum die von Weinland und Riehl gefundene Anhäufung in der Leber. Doch wollen wir auch hier gleich bemerken, daß auch in dieser Richtung ein Parallelismus zwischen dem Verhalten des Glykogens und des Fettes vorhanden ist, da unsere Tiere auch Fettanhäufung in der Leber nach dem Winterschlafe zeigten. Es wandern also die Substanzen, die während des Winterschlafes verbraucht wurden, aus den andern Geweben in die Leber ein. Mit aller Reserve sei hier bemerkt, daß das auf eine Rolle hinweist, welche die Leber vielleicht bei der Zersetzung der Körpersubstanz spielt.

Schreiten wir nunmehr zur Betrachtung des Verhaltens der Fette. Tabelle II zeigt den Gehalt an höheren Fettsäuren zu Beginn des Winterschlafes zu 19,6%. Rechnet man diese Zahl mittels der später noch anzugebenden Neutralisationszahl der Fettsäure (Verseifungszahl der Fette) auf Triglyceride um, so erhöht sich diese Zahl auf 20,9. Es wird allgemein angegeben, daß dem Winterschlafe eine außerordentlich hochgradige

Fettmast vorhergeht. Der hier vorgefundene Fettgehalt könnte nun im ersten Momente als nicht sehr hoch erscheinen, und er ist ja auch nur von mittlerer Höhe, wenn man zum Vergleiche etwa fette Menschen heranzieht. Es haben jedoch vor kurzem Boycott und Damant[1]) eine größere Anzahl kleiner Tiere auf ihren Gesamtfettgehalt untersucht und dabei gefunden, daß bei kleineren Tierspezies und im besonderen wiederum bei kleineren Exemplaren der Fettgehalt geringer ist als bei großen. Sie bedienten sich bei ihrer Untersuchung der Methode von Liebermann und verseiften also die ganzen Gewebe, weshalb ihre Resultate mit den hier mitgeteilten gut vergleichbar sind. Sie fanden für zahme Ratten bei einem Körpergewicht von 100 bis 149 g den Fettgehalt im Maximum zu 16,1%, bei einem Körpergewichte von 25 bis 49 g, im Maximum zu 9,2%, im Durchschnitte zu 4,1%. Diese letztere Gruppe von Tieren ist, wie man sieht, an Körpergewicht unseren Fledermäusen ähnlich und hat dabei viel weniger Fett im Körper. Ähnliches ergibt sich aus den Befunden der genannten Autoren in bezug auf Meerschweinchen und zahme Mäuse. Sie untersuchten auch Winterschläfer, nämlich Haselmäuse, unmittelbar vor dem Winterschlafe und fanden für Tiere von dem Körpergewichte von 20 bis 25 g einen Fettgehalt von durchschnittlich 23,1 g Es bestätigen also ihre und die hier berichteten Analysen die allgemein verbreitete Anschauung, daß Winterschläfer zu Beginn der Schlafperiode eine besondere hochgradige Fettleibigkeit aufweisen, in dem Sinne, daß sie fettreicher sind, als andere Tiere von ungefähr derselben Körpergröße zu sein pflegen.

Nach ungefähr 60 Tagen Winterschlafes zeigen unsere Tiere nur mehr 13,7% Fettsäuren oder 14% Fett, das ist auf das Anfangsgewicht bezogen 11,4% Fettsäuren, entsprechend 12,1% Fett. Der Fettverbrauch beträgt daher im ganzen für 100 g Anfangsgewicht des Tieres 8,9 g für die Schlafzeit von rund 60 Tagen. Mithin zersetzten unsere Fledermäuse pro 100 g und Tag 0,148 g Fett. Da der Verbrennungswert von 1 g Fett etwa 9,3 Calorien beträgt, so ergibt sich eine Energieentwicklung aus Fett im Betrage von 1,38 Calorien. Gegenübe der aus Fett erzeugten Energiemenge tritt die aus

[1]) Boycott und Damant, The Journ. of Physiol. 38, 25, 1908.

andern Substanzen etwa herrührende ganz in den Hintergrund, und wir können also schließen, daß eine Fledermaus im mittleren Gewichte von 28,4 g pro Schlaftag 0,392 oder rund 0,4 Calorien entwickelt hat. Um aus dieser Zahl einen Vergleich zwischen normalem und Schlafstoffwechsel abzuleiten, können wir vom Minimalstoffwechsel des Menschen ausgehen, wenn wir uns an das bekannte Rubnersche Gesetz erinnern, daß der Stoffumsatz nicht dem Körpergewichte proportional ist, sondern sich wie das Quadrat der 3. Wurzel des Körpergewichtes verhält. Als Stoffwechselminimum für den normalen erwachsenen Menschen wollen wir mit Tigerstedt[1]) eine Calorie pro Kilogramm und Stunde annehmen. Ein Mensch von 65 kg würde demnach in diesem Zustande des minimalen Stoffwechsels, der nur bei länger dauerndem Hunger und vollständiger Muskelruhe vorhanden ist, pro Tag 1560 Calorien ansetzen. Auf das Gewicht von 28,4 g, in der angegebenen Weise umgerechnet, ergibt sich ein Energieumsatz von 8,98, also ungefähr 9 Calorien. Der Energieumsatz unserer Fledermäuse war mithin durch den Winterschlaf auf etwa 4% jenes Wertes herabgesetzt, der bei vollständiger Ruhe und Hunger, aber Wachzustand, zu erwarten wäre.

Dieser Befund reiht sich im ganzen gut den (natürlich innerhalb gewisser Grenzen schwankenden) Befunden verschiedener Beobachter an. Nagai beispielsweise, der verschiedene Tierspezies, wenn auch keine Fledermäuse, untersucht hat, um einen Autor aus jüngster Zeit anzuführen, findet den O-Verbrauch 20 mal geringer als im Wachzustande. Hári fand bei Fledermäusen die Größe des respiratorischen Umsatzes im Winterschlafe gegenüber dem Wachzustande auf einige Prozente herabgedrückt. Die Lebern enthielten vor dem Winterschlafe pro Tier 0,0195 g, nachher 0,0263 g Fettsäuren; auf 100 g Tier (Anfangsgewicht) bezogen, betrug die Fettsäuremenge vor dem Winterschlafe 0,069, nach dem Winterschlafe 0,098 g. Von dieser Differenz war schon die Rede. Die Leberfettsäuren wurden in die weiteren Untersuchungen (über die Zusammensetzung der Fette) nicht einbezogen.

---

[1]) Tigerstedt, Arch. di Fisiologia 7, 426, 1909 und Skand. Arch. f. Physiol. 23, 302, 1910.

Wenden wir uns nunmehr der Besprechung jener Befunde zu, die sich auf die Zusammensetzung des Fettes bei Beginn des Winterschlafes und 2 Monate später beziehen. Die Neutralisationszahl der Fettsäuren, also die der Verseifungszahl der Fette entsprechende Zahl, betrug vor dem Winterschlafe bei Fledermaus Nr. 2: 213 und bei den Fledermäusen Nr. 20, 21 und 22: 224, im Mittel mithin: 221. Die Neutralisationszahl des Fledermausfettes ist mithin eine ziemlich hohe, wie sich aus dem Vergleiche mit den Neutralisationszahlen der Säuren anderer tierischer Fette ergibt. Aus der Zusammenstellung von Lewkowitsch[1]) sollen hier einige Zahlen angeführt werden: Rindstalg 197,2, Knochenfett 200, Schweinefett 201,8, Hammeltalg 210, Butterfett und Pferdemarkfett 215. Nach dem Winterschlafe betrug die Neutralisationszahl 200,5. Es deutet dies wohl darauf hin, daß zunächst die Fettsäuren von kleinerem Moleküle verbrannt werden, von denen die Fledermäuse zu Beginn des Winterschlafes mehr enthalten als andere Tiere.

Die Jodzahl betrug vor dem Winterschlafe 71,7, nach dem Winterschlafe wurden bei 3 verschiedenen Gruppen von Tieren folgende Werte erhoben: 88,3, 88,9 und 95,0. Auch hinsichtlich der Jodzahl zeigen mithin die Fette des Fledermauskörpers einen ziemlich hohen Wert. Damit stimmt es überein, daß diese Fettsäuren nicht vollständig erstarrten, sondern auch in der Kälte noch eine dickflüssige Beschaffenheit annahmen. (Das Leberfett erstarrte vollständig.) Ähnlich beobachtete Dubois[2]), daß das Fett der Murmeltiere eher die Beschaffenheit eines Öles hatte und erst bei — 1° die Konstanz von Butter annahm. Zum Vergleiche der gefundenen Jodzahl mit anderen seien auch hier aus der Zusammenstellung von Lewkowitsch die Jodzahlen der Fettsäuren einiger Säugetierarten angegeben: So finden wir für Hammeltalg nur 34,8, für Rindstalg 41,3, Hundefett 50,15, Katzenfett 54,8, Pferdemarkfett 72 (also ungefähr ebenso hoch, wie unsere Fledermäuse vor dem Winterschlaf), Dachsfett 73 und Wildschweinfett 81,2.

---

[1]) Lewkowitsch, Chem. Technologie und Analyse der Öle, Fette und Wachse. Braunschweig 1905.

[2]) R. Dubois, Étude sur le mécanisme de la thermogenèse et du sommeil chez les mammifères. Physiologie comparée de la marmotte. Annales de l'université de Lyon 25, 95, 1896.

Die halbflüssige Konsistenz der Fettsäuren der Winterschläfer gibt zu einer Bemerkung Anlaß. Es ist bekannt, daß das Körperfett einen um so niedrigeren Erstarrungspunkt hat, je näher es der Körperoberfläche liegt. Ferner haben die Seetiere, deren Hautoberfläche einer starken Wärmeabgabe ausgesetzt ist, flüssiges Körperfett. In Analogie hiermit könnte man die wenig feste Konsistenz des Fettes der Winterschläfer von einem teleologischen Standpunkte aus damit erklären, daß diese Tiere eines Fettes bedürfen, das auch bei herabgesetzter Körpertemperatur flüssig bleibt.

Die Vermutung, daß die ungesättigten Fettsäuren im Organismus leichter angegriffen wurden als die gesättigten, hat sich nicht bestätigt, denn in diesem Falle wäre ein Absinken der Jodzahl zu erwarten gewesen. Es trat jedoch das Gegenteil, wenn auch in geringem Maße, ein.[1])

Endlich hätten wir noch über die Acetylzahl der Fettsäuren als Maß der alkoholischen Hydroxylgruppen zu sprechen. Die Acetylzahl tierischer Fette und Fettsäuren sind vor kurzem von Nukada[2]) untersucht worden. Es zeigte sich, daß frisches tierisches Fett stets sehr niedrige Acetylzahl hatte, daß also Oxysäuren nur in sehr geringer Menge unter der Fettsäure sich vorfinden. Ganz Analoges ergab die Untersuchung des Fledermausfettes. Die Acetylzahl, die genau nach den Vorschriften Lewkowitschs ausgeführt wurde, schwankte vor dem Winterschlafe nur zwischen 3,1 und 6,0. Aber auch nach dem Winterschlafe wurde keine erhöhte Acetylzahl gefunden (3,1 und 3,9). Es haben sich also keine Oxysäuren oder mindestens keine höheren Oxysäuren als Zwischenprodukte der Fettverbrennung nachweisen lassen. Es hat mithin wenig Aussicht, die Ursache des abnorm niedrigen respiratorischen Quotienten während des Winterschlafes auf eine O-Speicherung durch unvollständige Fettverbrennung zu beziehen. Auch die Bildung von Kohlenhydraten

---

[1]) Anm. bei der Korrektur. Während der Indrucklegung dieser Mitteilung erschien eine Arbeit von Sasaki (diese Zeitschr. 25, 272), die es wahrscheinlich macht, daß die gesättigten Fettsäuren über ungesättigte abgebaut werden. Die Erhöhung der Jodzahl während des Winterschlafes könnte demnach ihre Ursache in einer Anhäufung dieser intermediären Stoffwechselprodukte haben.

[2]) Nukada, diese Zeitschr. 14, 1908.

aus Fett scheint nicht die richtige Erklärung für diese Erscheinung darzustellen. Viel wahrscheinlicher ist es hingegen nach den Untersuchungen von Nagai, daß die Zersetzung der Eiweißkörper im Winterschlafe eine abnorme ist. Er fand nämlich die N-Verteilung im Harn im Sinne einer Vermehrung der Aminosäurefraktion abweichend, und so kann man annehmen, daß die von ihm gefundene Milchsäure als Eiweißzersetzungsprodukt und nicht als Abbaustufe der Fette auftritt.

Fassen wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen zusammen, so können wir etwa folgendes sagen: Unsere Fledermäuse verloren während der ersten 2 Monate ihres Winterschlafes pro Tag durchschnittlich 0,26 % ihres Körpergewichtes, wovon etwas mehr als die Hälfte auf Fettverlust zu beziehen ist. Während des Winterschlafes fand eine Glykogenbildung nicht statt, es wurde vielmehr Glykogen zersetzt. Während die absolute Größe der Glykogenzersetzung natürlich viel geringer ist als die der Fettzersetzung, ist der Bruchteil des Gesamtvorrates beider Substanzen, der in einer bestimmten Zeit verbraucht wurde, nicht sehr verschieden.

Während des Winterschlafes häufte sich sowohl Fett als Glykogen in der Leber an. Die quantitative Zusammensetzung der Fette änderte sich während des Winterschlafes nur wenig. Eine vor dem Winterschlafe vorhandene, geringe Menge von Fettsäuren mit kleinerem Molekül als das der Palmitinsäure, verfiel zuerst dem Abbau; im übrigen wurden die verschiedenen Fettsäuren ungefähr im Verhältnisse der vorhandenen Mengen zersetzt. Höhere Oxyfettsäuren wurden während des Winterschlafes nicht gebildet.

Über einige Versuche zum Abbaue der Cholsäure.

II. Mitteilung.

Über Destillationsprodukte aus Cholsäure und Biliansäure.

Von

Otto v. Fürth und Emil Lenk, Wien.

(Eingegangen am 9. Mai 1910.)

I. Einleitung.

Die Erkenntnis, daß der Atomverband der Cholsäure und der Biliansäure ein so festes Gefüge besitzt, daß zum mindesten der Hauptanteil des Moleküls selbst einem Eingriffe, wie es die Kalischmelze[1]) ist, Widerstand zu leisten vermag, legte den Gedanken nahe, daß die Untersuchung der bei der trockenen Destillation aus der Cholsäure und ihren Derivaten resultierenden Produkte dem Studium ihrer Konstitution vielleicht zustatten kommen könnte.

Schon vor mehr als 30 Jahren hat Destrem[2]) im Laboratorium Schützenbergers die Entdeckung gemacht, daß bei Zinkstaubdestillation der Cholsäure ein Kohlenwasserstoff auftritt. „Par destillation sèche de l'acide cholalique $C_{24}H_{40}O_5$ en présence de Zinc en poudre on obtient un carbure d'hydrogène, répondant à la formule $C_{24}H_{32}$. Le carbure commence à destiller à 215°. La température s'élève ensuite progressivement jusqu'à 325°. Les dernières portions qui destillent sont très visqueuses."

Dieses Produkt ist später von Schotten[3]) untersucht worden. Er sagt darüber folgendes: „Erhitzt man trockene Cholalsäure in einer Retorte über ihren Schmelzpunkt hinaus, so entweicht anfangs reichlich Wasser; bei weiterem Erhitzen erhält man eine ruhig siedende Flüssig-

[1]) Vgl. O. v. Fürth und E. Jerusalem, Über einige Versuche zum Abbau der Cholsäure. I. Über die Einwirkung der Kalischmelze auf Biliansäure. Diese Zeitschr. 20, 375, 1909.

[2]) A. Destrem, Note sur l'acide cholalique. Compt. rend. de l'Acad. 87, 880, 1878; auch Bull. Soc. chim. 33, 187, 1880.

[3]) C. Schotten, Zur Kenntnis der Gallensäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 197, 1886.

keit, die überdestilliert unter Hinterlassung eines nur ganz geringen kohligen Rückstandes. Bei dieser Destillation der Cholalsäure wird keine Kohlensäure abgespalten. . . . Das von Wasser befreite Destillat ist ein zähflüssiges, gelbes oder gelbbraunes, grün fluorescierendes Öl. Bei einem Druck von nur 80 mm Hg destilliert unterhalb 270° so gut wie nichts, von 270 bis 300° ganz wenig, dann steigt die Temperatur rasch über 360°. Auch die oberhalb dieser Temperatur überdestillierende Hauptmenge bleibt flüssig, wenn auch recht zähflüssig. Mit Wasserdämpfen ist das Öl nicht flüchtig." — Auf Grund einiger Analysen des Destillationsproduktes sah Schotten dasselbe als ein Anhydrid der Cholsäure an ($2C_{24}H_{40}O_5 - 7H_2O = C_{48}H_{66}O_3$).

Beim Erhitzen von cholsaurem Kalk oder Baryt mit Kalk oder Barythydrat und nachfolgender Wasserdampfdestillation erhielt Schotten ein gelbliches, auf dem Wasser schwimmendes Öl von terpentinartigem Geruch, das im trockenen Zustande schon unter 100° zu sieden begann, worauf die Temperatur allmählich bis 280° stieg. Einige Analysen des bei etwa 130° übergegangenen Anteils (C 78,6 bis 80,2%, H 10,8 bis 11,1%) führten zu dem Schlusse, „daß hier jedenfalls keine reinen Kohlenwasserstoffe, sondern entweder nur sauerstoffhaltige Körper oder Gemische von solchen mit Kohlenwasserstoffen vorlagen".

Schließlich hat Pregl[1]) Cholalsäure der Zinkstaubdestillation unterworfen und das Destillat in einen mit Wasserdampf flüchtigen, auf Wasser schwimmenden und einen nicht flüchtigen, in Wasser untersinkenden Anteil geschieden. Eine weitere Trennung durch wiederholte Fraktionierung gelang nicht, es wurde vielmehr stets dasselbe gleichmäßige Ansteigen der Temperatur und eine Zunahme der hoch siedenden Anteile auf Kosten der niedriger siedenden gefunden. „Aus diesen Beobachtungen war zu entnehmen, daß das Zinkstaubdestillat ein Gemisch mehrerer Kohlenwasserstoffe ist, die durch fraktionierte Destillation nicht nur nicht trennbar sind, sondern bei derselben sogar im Vakuum Zersetzungen erleiden." Pregl hat keine Analysen des Destillates vorgenommen, dagegen noch zwei wichtige Tatsachen konstatiert. Er fand nämlich einerseits, daß jede Portion des Destillates erhebliche Mengen von Brom in CS_2-Lösung unter Entbindung von Bromwasserstoff zu entfärben vermag, sich demnach wie eine gesättigte Verbindung verhält; andererseits konstatierte er, daß jede Portion mit kalter konzentrierter Salpetersäure in der Weise reagiert, daß unter spontaner Erwärmung lebhafte Oxydation und Lösung eintritt. Auf Zusatz von Wasser fielen schwefelgelb bis braun gefärbte, stickstoffhaltige Produkte, anscheinend Nitrokörper aus, die jedoch nicht zur Krystallisation gebracht werden konnten.

Genaueres über die Natur der bei der trockenen Destillation der Cholsäure und ihrer Derivate auftretenden Produkte ist

[1]) F. Pregl, Über die Darstellung und einige Reaktionen der Cholalsäure. (Aus dem physiologischen Institut der Universität Graz.) Pflügers Archiv 71, 307, 1898.

also nicht bekannt. Wir haben es daher für eine nicht undankbare Aufgabe gehalten, diese Substanzen zum Gegenstande einer genaueren Untersuchung zu machen, trotzdem die sehr großen Schwierigkeiten einer solchen schon aus dem oben Mitgeteilten zur Genüge hervorgehen.

II. Darstellung der Destillationsprodukte.

Hinsichtlich der Darstellung des Ausgangsmaterials an Cholsäure und Biliansäure sei auf die diesbezügliche Bemerkung in der Arbeit, die der eine von uns kürzlich gemeinsam mit Jerusalem[1]) veröffentlicht hat, hingewiesen.

Bei unseren späteren Versuchen hat sich uns für die Darstellung der Cholsäure folgender vereinfachter Vorgang als zweckmäßig erwiesen:

5 kg ganz frischer Rindergalle wurden mit 1 l 30%iger Kalilauge versetzt, 20 Stunden lang in einem Topfe mit aufgesetztem Deckel gekocht, mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und so lange mit Chlorbariumlösung versetzt, bis sich eine Probe des Filtrates durch dieses Reagens nicht mehr als fällbar erwies. Nunmehr wurde filtriert und das Filtrat mit Salzsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abdekantiert, mit Wasser gewaschen, sodann mit ein wenig Alkohol 95% geknetet, die Flüssigkeit abgegossen, nunmehr neuerlich mit Alkohol 95% durchgeknetet und in der Winterkälte stehen gelassen. Es erfolgte langsame Umwandlung in einen Krystallbrei. Dieser wurde nach längerem Stehen auf einem Nutschfilter scharf abgesaugt, in einem geringen Volumen heißen 95%igen Alkohols gelöst, die Flüssigkeit durch einen Heißdampftrichter filtriert und nunmehr in flachen Schalen bei Zimmertemperatur der spontanen Krystallisation überlassen. Die Krystallkrusten wurden sodann von der Mutterlauge getrennt und wiederholt in gleicher Weise umkrystallisiert.

Dieser Vorgang nahm, wegen der langwierigen Prozeduren des Umkrystallisierens, zwar ziemlich lange Zeit in Anspruch, doch waren die so erhaltenen Krystallindividuen gut ausgebildet.

Eine größere Partie Cholsäure verdankten wir der besonderen Freundlichkeit des Herrn Prof. Pregl. Dieselbe wurde nach dem Langheldschen Verfahren in cholalsaures Natrium übergeführt und die daraus in Freiheit gesetzte Säure aus Alkohol umkrystallisiert.[2])

Zur Gewinnung des Destillationsproduktes wurde die getrocknete bzw. von Krystallalkohol befreite Säure in Mengen von 10 bis 50 g in einer tubulierten Retorte aus Jenaer Glas über freier Flamme erhitzt. Bald, nachdem die Masse

[1]) O. v. Fürth und E. Jerusalem, l. c.

[2]) Vgl. Pregl, Über die gemeinsame Konstitution der drei spezifischen Gallensäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 163, 1910.

ins Schmelzen gekommen war, begann das Entweichen der Destillationsprodukte. Ganz zu Beginn der Destillation wurde stets die Bildung eines wachsartigen Produktes beobachtet, das später nicht mehr auftrat und unschwer von der Hauptmenge der übrigen Destillationsprodukte abgetrennt werden konnte.

Bei stärkerem Erhitzen sammelten sich bald Öltropfen in der Vorlage an. Um einen flotten Gang der Destillation zu erzielen, wurde nunmehr mit einem großen Teclubrenner stark erhitzt und die Destillation so lange fortgesetzt, bis das Übergehen zäher, harziger Tropfen das Ende der Operation anzeigte.

Die Menge des so gewonnenen Rohöls betrug stets ein Drittel, unter Umständen jedoch auch mehr als die Hälfte des Ausgangsmateriales.

Wir haben wiederholt Versuche ausgeführt, um die offenbar während des Destillationsvorganges sich abspielende Verharzung durch Zusatz von reduzierenden und wasserentziehenden Mitteln (wie Eisenfeile, Zinkstaub, Phosphorsäureanhydrid) hintanzuhalten. Da wir aber irgend einen Effekt dieser Zusätze nicht bemerkt haben, gingen wir bei den späteren Versuchen stets in der beschriebenen einfachen Art vor.

Ebenso blieben alle Versuche ohne Erfolg, durch eine fraktionierte Destillation des Rohöles mit und ohne derartige Zusätze die Abtrennung irgend eines durch einen konstanten Siedepunkt ausgezeichneten Produktes zu erzielen. Stets gingen bei niederen Temperaturen helle, dünnflüssige, bei höheren dunklere und zähere Anteile über, ohne daß ein deutliches Verharren des Quecksilbers bei irgend einer Temperaturstufe bemerkbar gewesen wäre. Wurden die ersten Portionen des Destillates neuerlich destilliert, so zeigte sich wieder dasselbe Verhalten und spielte sich der Verharzungsvorgang demnach direkt unter den Augen des Beobachters ab. Auch der Versuch der Vakuumdestillation bei sehr niedrigem Drucke änderte an diesem Bilde nichts, ja nicht einmal die Anwendung des Kathodenvakuums, die mit Hilfe der Krafftschen Versuchsanordnung erzielt wurde.

Eine weit rationellere, weil ohne Verharzung mögliche Fraktionierung des Rohöles erzielten wir dagegen durch Destillation mit Wasserdampf, der mit Hilfe einer Kupferspirale stark überhitzt worden war. Dabei destillierten nur die leichter flüchtigen Anteile des Rohöles langsam über. Wir pflegten so vorzugehen, daß wir die Destillation so lange fortsetzten, bis

nur mehr Spuren des flüchtigen Öles im Destillate auftraten, was einige (3 bis 5) Tage in Anspruch nahm. Die Hauptmenge des Rohöles blieb dabei im Destillationskolben als nicht flüchtiger Anteil zurück. Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen beziehen sich in erster Linie auf den flüchtigen Anteil, der unter Umständen auch in mehreren Fraktionen verarbeitet wurde. Wir mußten für die Möglichkeit, in dieser Art ein Reinigungs- und Trennungsverfahren einzuschalten, den Umstand in den Kauf nehmen, daß das mit Wasserdampf flüchtige Produkt nur in geringer Ausbeute (dezigrammweise, im besten Falle grammweise) erhältlich war und daß es infolgedessen mühevoller Arbeit bedurfte, um das für die Analysen erforderliche Material zu gewinnen.

Die schwer flüchtigen, weitaus die Hauptmenge des Produktes ausmachenden Anteile des Rohöles dienten zu orientierenden Versuchen, die sich insbesondere auf den weiteren Abbau desselben durch Oxydation mit Permanganat und mit Salpetersäure bezogen.

Die weitere Verarbeitung des durch Wasserdampfdestillation erhaltenen flüchtigen Produktes erfolgte in der Weise, daß das in Form gelber Tropfen auf dem Wasser der Vorlagen schwimmende Öl mit Hilfe eines Scheidetrichters in Äther aufgenommen wurde. Es konnte so aus dem nach der tagelangen Destillation auf das Volumen vieler Liter angewachsenen Destillate auf ein geringes Volumen konzentriert werden. Die abgetrennte ätherische Lösung wurde durch tagelanges Stehen über geglühtem Kupfersulfat sorgfältig entwässert, filtriert und vorsichtig eingedunstet. Die Trocknung erfolgte für Zwecke der Analyse in der Regel im Trockenschranke bei 110 bis 130°. In manchen Fällen jedoch, insbesondere dort, wo es auf Feststellung der Molekularrefraktion ankam, erfolgte die Trocknung im Vakuum über Schwefelsäure, um die unvermeidliche Verharzung nach Möglichkeit einzuschränken.

Ein konstanter Siedepunkt war dem flüchtigen Öle ebensowenig eigentümlich, wie dem Rohöle. Beim Fraktionierungsversuch unter Atmosphärendruck ging unterhalb 200° nichts über. Bei einem Drucke von 20 bis 60 mm sahen wir in der Regel den Hauptanteil zwischen 160 bis 195° in Form eines gelben Öles übergehen, wobei der Anstieg des Thermometers ein stetiger war und der Rest des Produktes wiederum der typischen Verharzung anheimfiel.

Auch der Versuch, durch energische Reduktion zu einem konstanteren Produkte zu gelangen, blieb ergebnislos. Ein dunkelgefärbtes Öl nahm, in Amylalkohol gelöst, beim Eintragen von metallischem Natrium in die unter Rückflußkühlung siedende Flüssigkeit allerdings eine helle weingelbe Färbung an. Nach Beendigung der Prozedur begann die Flüssigkeit jedoch sogleich wieder nachzudunkeln und hatte über Nacht wieder die ursprüngliche schwärzliche Färbung angenommen.

Die bei Beginn der Destillationen auftretenden wachsartigen Substanzen erwiesen sich einer weiteren Reinigung recht wohl zugänglich. Dieselben wurden, noch bevor die Destillation der schwerer flüchtigen Produkte begonnen hatte, aus der Vorlage entfernt und nunmehr, um sie von dem ihnen anhaftenden Öle vollständig zu befreien, einer 2tägigen Wasserdampfdestillation unterworfen. Dabei ging das Wachs nur spurenweise, das anhaftende leicht flüchtige, penetrant riechende Öl jedoch vollständig über. Das nunmehr fast geruchlose Wachs wurde in Alkohol aufgenommen, der Alkohol abgedunstet, der Rückstand in Äther gelöst, die Lösung im Scheidetrichter mit Wasser gewaschen, über geglühtem Kupfersulfat 3 Tage lang getrocknet, der Äther abgedunstet und das Wachs bei 120° getrocknet.

Wir gehen nunmehr zur Mitteilung unserer analytischen Ergebnisse über.

III. Analyse der öligen, mit Wasserdampf flüchtigen Destillationsprodukte.

1.

Elementaranalysen.[1])

A. Öl aus Cholsäure.

1. 0,1347 g Substanz gaben 0,4399 g CO_2 (= 89,07% C) und 0,1258 g H_2O (= 10,45% H).

2. 0,1060 g Substanz gaben 0,3460 g CO_2 (= 89,02% C) und 0,0993 g H_2O (= 10,48% H).

Mittel: C = 89,05%
H = 10,47 „
99,52%

B. Öl aus Biliansäure (Isobiliansäure).

Bei der Darstellung des Präparates nach dem Vorgange von Lassar-Cohn wurde im Interesse der Ausbeute auf eine

[1]) Da unser Laboratorium leider die Einrichtungsmöglichkeit für Elementaranalysen nach Liebig nicht bietet und nur die Aufstellung

Trennung der Biliansäure von der Isobiliansäure verzichtet und das Gemenge beider der Destillation unterworfen.

Das erhaltene Rohöl wurde der Wasserdampfdestillation unterworfen und das Destillat in 2 Fraktionen aufgefangen, derart daß die I. Fraktion die vom 1. bis 3. Tage, die II. Fraktion die vom 4. bis 5. Tage übergegangenen Anteile umfaßte.

I. Fraktion:

1. 0,1074 g Substanz gaben 0,3527 g CO_2 (= 89,57% C) und 0,0983 g H_2O (= 10,24% H).

2. 0,1211 g Substanz gaben 0,3973 g CO_2 (= 89,49% C) und 0,1105 g H_2O (= 10,21% H).

3. 0,1587 g Substanz gaben 0,5197 g CO_2 (= 89,31% C) und 0,1422 g H_2O (= 10,03% H).

4. 0,1020 g Substanz gaben 0,3338 g CO_2 (= 89,25% C) und 0,0933 g H_2O (= 10,24% H).

Mittel: 89,40% C
10,18 „ H
99,58%

II. Fraktion:

0,1230 g Substanz gaben 0,4038 g CO_2 (= 89,53%) und 0,1139 g H_2O (= 10,36% H).

89,53% C
10,36 „ H
99,89%

Neue Darstellung:

Analyse nach Dennstedt:

0,2552 g Substanz gaben 0,8455 g CO_2 (= 90,36% C) und 0,2375 g H_2O (= 10,35% H).

90,36% C
10,35 „ H
100,71%

C. Öl aus Ciliansäure.

Um zu konstatieren, ob jener Komplex, der bei trockener Destillation die charakteristischen Produkte liefert, auch noch beim Abbau der Biliansäure zu Ciliansäure erhalten bleibt,

---

eines Dennstedtschen Verbrennungsapparates gestattet, haben wir uns genötigt gesehen, die Hilfe eines fremden Laboratoriums in Anspruch zu nehmen, und sind die Mehrzahl der mitgeteilten Verbrennungen von Herrn Dr. H. Weil in München nach dem alten Verfahren und nur einige derselben von dem einen von uns (L.) nach Dennstedt ausgeführt worden.

haben wir einige Gramm eines Ciliansäurepräparates, das wir der Güte des Herrn Prof. F. Pregl verdankten, der trockenen Destillation unterworfen. Wir haben dabei jede Spur des Wachses vermißt, dagegen zeigte das überdestillierende Öl durchaus denselben Charakter wie die analogen aus Cholsäure und Biliansäure erhaltenen Produkte. Da wir in Anbetracht der geringen Menge nicht daran denken konnten, durch Wasserdampfdestillation zur Analyse ausreichende Mengen des flüchtigen Produktes zu erhalten, wurde das Destillationsprodukt in toto einer orientierenden Analyse unterzogen.

Zu diesem Zwecke wurde das Destillat in Äther gelöst, die ätherische Lösung mit geglühtem Kupfersulfat getrocknet, filtriert, eingedunstet, der Rückstand bei 110° getrocknet und nach Dennstedt verbrannt.

0,2420 g Substanz gaben 0,7977 g CO_2 (= 89,91% C) und 0,2202 g H_2O (= 10,08% H).

C = 89,91%
H = 10,08 „
99,99%

2.

Molekulargewichtsbestimmungen.

A. Öl aus Cholsäure.

1. Siedepunkt in Eisessig.

Eisessig („für Molekulargewichtsbestimmung", Kahlbaum) 40 ccm (K = 25,3).

a) 0,4093 g Substanz $\Delta = 0{,}142°$ M = 173
b) 0,6698 g „ $\Delta = 0{,}248°$ M = 162
c) 0,9012 g „ $\Delta = 0{,}343°$ M = 157
Mittel: 164

2. Siedepunkt in Chloroform.

30 ccm Chloroform (Kahlbaum), (K = 35,9, spez. Gew. = 1,527).

a) 0,2164 g Substanz $\Delta = 0{,}080°$ M = 212
b) 0,3698 g „ $\Delta = 0{,}161°$ M = 180
Mittel: 196

3. Siedepunkt in Aceton.

30 ccm Aceton (Kahlbaum), spez. Gew. 0,792 (K = 17,1).

a) 0,2885 g Substanz $\Delta = 0{,}080°$ M = 215
b) 0,4585 g „ $\Delta = 0{,}151°$ M = 219
Mittel: 217

B. Öl aus Biliansäure.

1. Siedepunkt in Eisessig. (I. Fraktion s. o.)

30 ccm Eisessig (Kahlbaum) ($K = 25{,}3$).

a) 0,3312 g Substanz $\Delta = 0{,}170°$ $M = 156$
b) 0,6078 g „ $\Delta = 0{,}299°$ $M = 162$
c) 0,7821 g „ $\Delta = 0{,}387°$ $M = 161$
Mittel: 160

2. Siedepunkt in Eisessig. (II. Fraktion s. o.)

30 ccm Eisessig (Kahlbaum) $K = 25{,}3$).

a) 0,2880 g Substanz $\Delta = 0{,}128°$ $M = 179$
b) 0,6142 g „ $\Delta = 0{,}275°$ $M = 178$
Mittel: 178,5

3. Gefrierpunkt in Eisessig.

20 ccm Eisessig (Kahlbaum) ($K = 39{,}0$).

a) 0,2118 g Substanz $\Delta = 0{,}219°$ $M = 179$
b) 0,4449 g „ $\Delta = 0{,}480°$ $M = 171$
Mittel: 175

4. Siedepunkt in Aceton.

30 ccm Aceton (Kahlbaum) spez. Gew. 0,792 ($K = 17{,}1$).

a) 0,2268 g Substanz $\Delta = 0{,}075°$ $M = 218$
b) 0,4198 g „ $\Delta = 0{,}144°$ $M = 210$
Mittel: 214

Überblicken wir nunmehr die Resultate unserer Elementaranalysen und Molekulargewichtsbestimmungen, so sehen wir, daß etwa folgende Kohlenwasserstoffe in der Breite derselben Platz finden dürften:

$C_{12}H_{16}$	$C_{13}H_{18}$	$C_{14}H_{18}$	$C_{15}H_{20}$	$C_{16}H_{22}$
C = 90,00%	89,65%	90,32%	90,00%	89,72%
H = 10,00 „	10,35 „	9,68 „	10,00 „	10,28 „
100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
160	174	186	200	214

$C_{17}H_{22}$	$C_{17}H_{24}$
C = 90,26%	89,48%
H = 9,74 „	10,52 „
100,00%	100,00%
226	228

Indem wir uns die Diskussion dieser Formeln für später vorbehalten, möchten wir hier nur erwähnen, daß die von Destrem für den Kohlenwasserstoff angenommene Formel $C_{24}H_{32}$ ($C = 90\%$, $H = 10\%$) in Anbetracht ihres Molekulargewichtes ($M = 320$) unbedingt verworfen werden muß.

3.

Halogenadditionsversuche.

1. Bromeinwirkung.

Vorgang nach Mac Ilheney[1]). 0,3612 g des mit Wasserdämpfen flüchtigen Öles aus Biliansäure; Zusatz von Bromwasser, dessen Bromgehalt 60,23 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$ entspricht. Nach Ablauf der Reaktion ist eine Brommenge, entsprechend 39,75 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$ verschwunden. Nach Zusatz von KJO_3 kommt wieder eine Brommenge entsprechend 24,92 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$ zum Vorscheine. In fester organischer Bindung ist verblieben eine Brommenge entsprechend 39,75 — 24,92 = 14,83 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$.

Daraus berechnet sich für 1 g des Öles ein Totalverbrauch von 0,880 g Brom, davon in fester organischer Bindung 0,328 g Brom.

Es entspricht dies pro Molekül

	Totalverbrauch	Feste Bindung
$C_{12}H_{16}$	1,87	0,66 Atome Brom
$C_{17}H_{24}$	2,50	0,93 „ „

2. Bromeinwirkung.

Vorgang wie oben. 0,2700 g des Öles aus Biliansäure wurden mit einem Bromüberschuß behandelt:

Brom vorgelegt	entsprechend	59,65 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$
Nach Zusatz von KJ zurücktitriert	„	20,14 „ „
Verschwundene Brommenge	„	39,51 „ „
Nach Zusatz von KJO_3 kommt wieder zum Vorscheine Brom . .	„	24,05 „ „
In organischer Bindung festgehaltenes Brom	„	15,46 „ „

Daraus berechnet sich für 1 g des Öles ein Totalverbrauch von 1,170 g Brom, davon in fester Bindung aufgenommen 0,457.

Es entspricht dies pro Molekül

	Totalverbrauch	Feste Bindung
$C_{12}H_{16}$	2,34	0,91 Atome Brom
$C_{17}H_{24}$	3,33	1,28 „ „

3. Jodeinwirkung.

Vorgang nach Hübl[2]). 0,9166 g Öl aus Biliansäure.

Vorgelegt 40 ccm Chlorjodlösung (Faktor 1,4205)	entsprechend	56,8 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$
zurücktitriert	„	4,3 „ „
Jod verbraucht	„	52,5 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$.

Daraus berechnet sich für 1 g des Öles ein Jodverbrauch von 0,7274 g.

[1]) cf. Hans Meyer, Analyse u. Konstitutionsermittelung organ. Verb. 2. Aufl. S. 950.

[2]) Hans Meyer, ibid. S. 952.

Es entspricht dies pro Molekül

$C_{12}H_{16}$ einem Jodverbrauch von 0,92 Atomen Jod
$C_{17}H_{24}$ „ „ „ 1,31 „ „

4. Jodeinwirkung.

Vorgang nach Hübl. 0,4851 g Öl aus Chlorsäure.
Jod verbraucht entsprechend 27,2 ccm $^n/_{10}$-$Na_2S_2O_3$.
Jodverbrauch für 1 g Öl = 0,7113 g.
Es entspricht dies pro Molekül

$C_{12}H_{16}$ einen Jodverbrauch von 0,90 Atomen Jod
$C_{17}H_{24}$ „ „ „ 1,28 „ „

5. Additionsversuche mit Halogenwasserstoffsäuren.

In Anbetracht der Möglichkeit einer Beziehung unserer Produkte zu den Ölen der Terpenreihe, die sich bekanntlich vielfach leicht mit den Halogenwasserstoffsäuren zu festen, gut krystallisablen Substanzen verbinden, wurden mehrfach größere Portionen unserer Rohöle in Eisessig oder Äther gelöst, mit rauchender Chlorwasserstoff- oder Bromwasserstoffsäure geschüttelt, bzw. durch Einleiten der trocknen Säuren in Gasform damit gesättigt. Doch wurde auch nach länger dauerndem Stehen in der Kälte in keinem Falle ein festes Additionsprodukt erhalten.

Aus den mitgeteilten Beobachtungen geht hervor, daß die untersuchten Kohlenwasserstoffe (oder Kohlenwasserstoffgemenge) keinesfalls aliphatische ungesättigte Bindungen enthalten, da ja sonst, je 1 Molekül entsprechend, mindestens 2 Atome Halogen addiert worden wären. Offenbar handelt es sich also nicht um Addition nach dem Typus

$$\begin{array}{l} | \\ -C \\ \| \\ -C \\ | \end{array} + Br_2 = \begin{array}{l} | \\ CBr \\ | \\ CBr \\ | \end{array}$$

sondern um Substitution an einem cyclischen Kerne nach dem Schema $RH + Br_2 = RBr + HBr$.

Berechnet man auf Grund des Mittels aus den gut untereinander übereinstimmenden Versuchen 2, 3 und 4, die sich auf Öle verschiedener Provenienz beziehen, das Molekulargewicht eines Kohlenwasserstoffes, unter der Annahme, daß 1 Atom H durch Halogen substituiert worden sei, so ergibt sich ein Molekulargewicht von etwa 177.

4.

Bestimmung der Molekularrefraktion.

Da sich demnach durch direkte Halogenaddition in unseren Produkten keine doppelten Bindungen direkt nachweisen ließen,

haben wir den Versuch gemacht, die An- oder Abwesenheit „maskierter" doppelter Bindungen durch Bestimmung der Molekularrefraktion sicherzustellen.

Bekanntlich ist die Molekularrefraktion, ermittelt nach der Formel von Lorenz und Lorentz

$$MR = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d}$$

wo R die spezifische Refraktion,
M das Molekulargewicht,
n den Brechungsindex,
d die Dichte bedeutet,

eine additive Eigenschaft, die sich aus der Summe der Atomfraktionen berechnen läßt und durch die Gegenwart mehrfacher Bindungen in erheblicher Weise beeinflußt wird, derart, daß die Größe der Molekularrefraktion, bei bekannter Bruttoformel und Molekulargröße einer Verbindung, einen Rückschluß auf die Anzahl der darin vorhandenen doppelten Bindungen gestattet.[1])

Zur Untersuchung gelangten je 2 Destillationsprodukte aus Cholsäure und aus Biliansäure, von verschiedenen Darstellungen herrührend. Sämtliche zur Bestimmung der Molekularrefraktion benutzten Präparate waren nach vorangeganger Behandlung der ätherischen Lösungen mit geglühtem Kupfersulfat nur im Vakuum bei Zimmertemperatur über Schwefelsäure, nicht aber bei höherer Temperatur getrocknet worden, um die Verharzung so viel wie möglich einzuschränken.

Die Bestimmung des Brechungsindex erfolgte mit Hilfe eines Abbeschen Refraktometers von Zeiß in Jena bei Natriumlicht oder bei Tageslicht.

Die angegebenen Werte sind durchwegs auf das Licht der Na-Linie bezogen. Die richtige Justierung des Instruments ist durch Kontrollbestimmungen mit reinem Wasser, Benzol, Chloroform, Xylol und Amylalkohol sichergestellt worden.

Zur Ermittlung der Dichte diente ein mit einem Thermometer versehenes Pyknometer, dessen Gefäß nur $^1/_3$ ccm faßte und das zu diesem Zwecke von der Firma F. Hugershof in Leipzig eigens angefertigt worden war.

---

[1]) Vgl. Nernst, Theoret. Chem. 5. Aufl. S. 311.

1a.	Öl aus Cholsäure,	$n = 1{,}545$,	$d = 0{,}9702$,	$R = \frac{n^2-1}{n^2+2} \cdot \frac{1}{d}$	$= 0{,}3259$
1b.	„ „ „	$n = 1{,}545$,	$d = 0{,}9704$,	„	$= 0{,}3258$
2.	„ „ „	$n = 1{,}539$,	$d = 0{,}9841$,	„	$= 0{,}3184$
3.	„ „ Biliansäure	$n = 1{,}515$,	$d = 0{,}9379$,	„	$= 0{,}3216$
4.	„ „ „	$n = 1{,}517$,	$d = 0{,}9527$,	„	$= 0{,}3177$
				Mittel	$0{,}3218$

Berechnet man nun auf Grund des für die spezifische Refraktion gefundenen Mittelwertes ($R = 0{,}3218$), die Molekularrefraktion für die beiden hier etwa in Betracht kommenden extremen Möglichkeiten (s. o.), nämlich für die beiden Formeln $C_{12}H_{16}$ und $C_{17}H_{24}$, so ergibt sich für

$$C_{12}H_{16} \ldots \quad MR = 0{,}3218 \times 160 = 51{,}49$$
$$C_{17}H_{24} \ldots \quad MR = 0{,}3218 \times 228 = 73{,}37$$

Berechnet man auf Grund der von Conrady[1]) für Natriumlicht ermittelten Atomrefraktionen, die Molekularrefraktion für die Formel $C_{12}H_{16}$ unter der Voraussetzung, daß nur einfache Bindungen vorhanden seien, so ergibt sich

$$C_{12} \ldots \quad 2{,}501 \times 12 = 30{,}012$$
$$H_{16} \ldots \quad 1{,}051 \times 16 = 16{,}816$$
$$46{,}828$$

Es besteht also gegenüber der tatsächlich beobachteten mittelbaren Molekularrefraktion eine Differenz von $51{,}49 - 46{,}83 = 4{,}66$

Da nun je eine doppelte Bindung ein Inkrement von 1,707 bewirkt, entspricht die beobachtete Differenz dem Vorhandensein von $\frac{4{,}66}{1{,}707} = 2{,}73$ doppelten Bindungen im Moleküle.

Führt man eine analoge Rechnung für die Formel $C_{17}H_{24}$ durch, so ergibt sich:

$$C_{17} \ldots \quad 2{,}501 \times 17 = 42{,}517$$
$$H_{24} \ldots \quad 1{,}051 \times 24 = 25{,}224$$
$$67{,}741$$

Es besteht also gegenüber der tatsächlich beobachteten mittleren Molekularrefraktion eine Differenz von $73{,}37 - 67{,}74 = 5{,}63$

[1]) Zeitschr. f. physik. Chem. **8**, 210, 1889. Vgl. Nernst, Theoret. Chemie. 5. Aufl. S. 311.

entsprechend dem Vorhandensein von

$$\frac{5{,}63}{1{,}707} = 3{,}29$$ doppelten Bindungen im Moleküle.

Die Beobachtung der Molekularrefraktion weist also (unabhängig davon, welche der in Betracht kommenden Formeln der Berechnung zugrunde gelegt wird) auf die wahrscheinliche Existenz dreier doppelter Bindungen im Moleküle hin.

IV. Analyse der wachsartigen Destillationsprodukte.

A. Wachs aus Biliansäure.

1. Analyse.

a) 0,1217 g Substanz gaben
0,3407 g CO_2 (= 76,41% C) und 0,1201 g H_2O (= 11,04% H)

b) 0,1048 g Substanz gaben
0,2931 g CO_2 (= 76,24% C) und 0,1020 g H_2O (= 10,89% H)

Mittel 76,32% C 10,97% H

2. Molekulargewichtsbestimmung.

Siedepunkt in Eisessig.

a) 0,2335 g Substanz $\Delta = 0{,}091°$ M = 205
b) 0,4415 g „ $\Delta = 0{,}161°$ M = 219

Mittel 212

B. Wachs aus Cholsäure.

1. Analyse. (Verbrennung nach Dennstedt.)

a) 0,1876 g Substanz gaben 0,5270 g CO_2 (= 76,60% C) und 0,1754 g H_2O (= 10,40% H).

2. Molekulargewichtsbestimmung.

Siedepunkt in Chloroform (reinstes Chloroform Kahlbaum) 30 ccm, spez. Gew. 1,527 (K = 35,9).

a) 0,2282 g Substanz $\Delta = 0{,}070°$ M = 256
b) 0,3633 g „ $\Delta = 0{,}113°$ M = 252

Mittel 254

C. Wachs aus Biliansäure.

1. Analyse. (Verbrennungen nach Dennstedt.)

a) 0,2220 g Substanz gaben
0,6401 g CO_2 (= 78,65% C) und 0,1995 g H_2O (= 10,00% H)

b) 0,1816 g Substanz gaben
0,5210 g CO_2 (= 78,25% C) und 0,1626 g H_2O (= 9,97% H)

Mittel 78,45% C 9,98% H

2. Molekulargewichtsbestimmung.

Siedepunkt in Chloroform (reinstes Präparat Kahlbaum), 30 ccm, spez. Gew. 1,527 (K = 35,9).

a) 0,3309 g Substanz $\Delta = 0{,}098^0$ M = 265
b) 0,5317 g „ $\Delta = 0{,}174^0$ M = 240
Mittel 253

Ein Blick auf die Resultate lehrt, daß die Präparate A und B offenbar miteinander identisch und von C verschieden waren.

Präparat A		Mittel	Präparat B	Berechnet für $C_{17}H_{28}O_2$	Berechnet für $C_{16}H_{26}O_2$
76,41% C	76,24% C	76,32% C	76,60% C	77,27% C	76,80% C
11,04% C	10,89% C	10,97% H	10,40% H	10,61% H	10,40% H
		12,71% O	13,00% O	12,12% O	12,80% O
		100,00	100,00	100,00	100,00
		M = 212	M = 254	M = 264	M = 250

Präparat C				Berechnet für $C_{18}H_{26}O_2$	Berechnet für $C_{17}H_{24}O_2$
78,65% C	78,25% C	78,45% C		78,83% C	78,46% C
10,00% H	9,97% H	9,98% H		9,49% H	9,23% H
		11,57% O		11,68% O	12,31% O
		100,00		100,00	100,00
		M = 253		M = 274	M = 260

Die wachsartigen Destillationsprodukte sind sonach sauerstoffhaltige Produkte. Man wird schwerlich fehlgehen, wenn man sie als labile, nur während der ersten Stadien des Destillationsprozesses auftretende Vorstufen der (die Hauptmenge der Destillationsprodukte bildenden) Kohlenwasserstoffe ansieht und vermutet, daß sie durch Abspaltung von Wasser bzw. Sauerstoff in dieselben übergehen; z. B. könnte ein Wachs $C_{17}H_{28}O_2$ durch Wasserabspaltung in einen Kohlenwasserstoff $C_{17}H_{24}$ (s. o.), oder ein Wachs $C_{16}H_{26}O_2$, ebenso in einen Kohlenwasserstoff $C_{16}H_{22}$, ein Wachs $C_{17}H_{24}O_2$ durch Sauerstoff- bzw. Wasserstoffabspaltung in einen Kohlenwasserstoff $C_{17}H_{24}$ oder $C_{17}H_{22}$ übergehen usw.

Zu dem Versuche, uns durch Analyse der bei neuerlicher trockener Destillation unserer Wachse auftretenden Produkte über diesen Zusammenhang volle Klarheit zu verschaffen, hat leider das Material nicht ausgereicht.

V. Einwirkung von Oxydationsmitteln auf die Destillationsprodukte.

A. Einwirkung von Permanganat.

Das obige Destillationsprodukt wurde bei stark alkalischer Reaktion von Permanganat angegriffen. Doch ging die Oxydation nur zögernd vor sich und mußte die Oxydation in einer sonst wenig üblichen Weise, nämlich in alkoholischer Lösung durchgeführt werden, um den gewünschten Effekt zu erzielen. Es brachte dies die Unbequemlichkeit mit sich, daß außerordentlich große Mengen des Oxydationsmittels angewandt werden mußten, von dem nur ein Bruchteil dem Öl gegenüber zur Wirkung gelangte, der Rest jedoch durch Oxydation des Lösungsmittels verloren ging. Auch war die Ausbeute sehr klein.

32 ccm des Rohöls wurden in 1 l Alkohol gelöst und die Lösung portionenweise mit im ganzen 1040 ccm einer 20%igen Calciumpermanganatlösung und mit 160 ccm Kjeldahllauge versetzt. Die Oxydation wurde so weit getrieben, bis in einer vom Braunsteinschlamm befreiten Probe auf Wasserzusatz keine Trübung mehr erfolgte, sonach nichts von dem ursprünglichen Produkte mehr vorhanden war. Nunmehr wurde der Braunsteinschlamm abgenutscht und mit siedend heißem Alkohol gewaschen. Der beim Eindunsten der vereinigten Filtrate hinterbleibende Rückstand wurde in Äther aufgenommen, die Lösung im Schütteltrichter erst mit verdünnter Salzsäure, dann mit Wasser gewaschen, die einen saueren Charakter aufweisende Substanz sodann aus dem Äther in verdünntes wässeriges Ammoniak übergeführt und die wässerige Lösung eingedampft. Der harzige Rückstand wurde nunmehr in Alkohol gelöst, die Lösung mit alkoholischer Quecksilberacetatlösung gefällt, der hellgelbe Niederschlag auf einem gehärteten Saugfilter gesammelt, mit heißem Alkohol, sodann mit absolutem Alkohol und absolutem Äther gewaschen und schließlich im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute 1,9 g des Quecksilbersalzes.

1. 0,2492 g Substanz gaben[1]) 0,2537 g CO_2 (= 27,77% C) und 0,0760 g H_2O (3,39% H).

2. 0,2575 g Substanz gaben 0,2620 g CO_2 (= 27,77% C) und 0,0792 g H_2O (= 3,42% H).

3. Quecksilberbestimmuug nach dem titrimetrischen Verfahren nach Rupp und Nöll[2]): 0,4259 g Substanz verbrauchten 23,6 ccm

[1]) d. h. Verbrennung wurde unter Vorlage von Goldblättchen ausgeführt.

[2]) Vgl. Hans Mayer, Analyse. III. Aufl. S. 293. Kontrollanalysen wurden mit abgewogenen Mengen Mercurinitrat (Kahlbaum) ausgeführt.

$^n/_{10}$-Rhodanammoniumlösung, entsprechend $23{,}6 \times 0{,}010015 = 0{,}2363$ g Hg $= 55{,}49\,\%$ Hg.

4. Quecksilberbestimmung: 0,2601 g Substanz verbrauchten 14,3 ccm $^n/_{10}$-Rhodanammonium, entsprechend $14{,}3 \times 0{,}010015 = 0{,}1432$ g Hg $= 55{,}06\,\%$ Hg.

			Mittel
C	27,77 %	27,77 %	27,77 %
H	3,39 %	3,42 %	3,40 %
Hg	55,49 %	55,06 %	55,27 %
O			13,56 %
			100,00 %

Daraus ergibt sich eine Relation

$$C_{3,37}H_{12,21}Hg_1O_{3,06}$$

oder

$$C_{16,74}H_{24,42}Hg_2O_{6,06}$$

Die Formel $C_{17}H_{24}Hg_2O_6$ erfordert die Werte:

C	28,18 %
H	3,31 %
Hg	55,24 %
O	13,27 %
	100,00 %

und wäre demnach als diejenige eines von dem Kohlenwasserstoffe $C_{17}H_{24}$ abgeleiteten Oxydationsproduktes zu deuten, während andere hier in Betracht kommende Formeln, wie z. B. $C_{16}H_{20}Hg_2O_6$, in minder guter Übereinstimmung mit den Analysenzahlen stehen oder aber, wie etwa die Formel $2\,C_{12}H_{16}O_2 \cdot 3\,HgO$, kompliziertere Annahmen erfordern.

B. Einwirkung von Salpetersäure.

Eine zweite und umfangreichere Versuchsreihe hatte die Einwirkung der Salpetersäure auf die öligen Destillationsprodukte zum Gegenstand, wobei wir an die eingangs zitierte Beobachtung Pregls[1]) anknüpften. Wir haben von diesen Versuchen vor allem deshalb eine gewisse Aufklärung erwartet, weil wir mit Bestimmtheit erwarten konnten, daß keine aliphatische Seitenkette der dauernden Einwirkung heißer, rauchender Salpetersäure auf die Dauer widerstehen würde. Man durfte demnach darauf rechnen, durch diesen Eingriff den unseren Produkten zugrunde liegenden cyclischen Kern sozusagen herauszuschälen, wobei man allerdings den Nachteil mit in den Kauf nehmen

[1]) l. c.

mußte, daß man desselben nur im nitrierten Zustande habhaft werden konnte und daß der Eintritt einer wechselnden Zahl von Nitrogruppen die Sachlage wesentlich komplizierte. Der überdies aus der mangelnden Krystallisationsfähigkeit der Nitroprodukte erwachsenden Unsicherheit in bezug auf die Deutung der analytischen Ergebnisse suchten wir, soweit dies eben möglich war, durch Analyse einer größeren Anzahl von Präparaten verschiedener Herkunft wenigstens teilweise abzuhelfen.

Um eine unnötige Weitschweifigkeit der Darstellung zu vermeiden, geben wir unsere Versuche tabellarisch wieder (siehe S. 424 und 425).

Schließlich noch einige Bemerkungen über die Eigenschaften unserer Nitroprodukte.

Dieselben waren in Wasser unlöslich, in der Mehrzahl der organischen Lösungsmittel in frisch gefälltem Zustande leicht löslich, doch sahen wir wiederholt nach scharfem Trocknen eine erhebliche Abnahme der Löslichkeit, derart, daß z. B. für die Molekulargewichtsbestimmungen nach dem Siedeverfahren schließlich nur Aceton und Eisessig übrig blieben. Leider versagten, wie erwähnt, die Bestimmungen aus uns unbekannten Gründen gänzlich. Nur in einem Falle gab eine Bestimmung einigermaßen brauchbare Ablesungen, aus denen sich ein Molekulargewicht von etwa 250 berechnen ließ. Wir mußten also auf eine Ermittlung des Molekulargewichtes leider verzichten.

Durch Reduktion einer alkoholischen Lösung des Nitroproduktes mit Zinnchlorür und Salzsäure wurde ein Produkt erhalten, dessen Lösung auf Alkalizusatz nicht mehr den für das Nitroprodukt charakteristischen Farbenumschlag aus Gelb in Rotbraun gab. Das Reduktionsprodukt zeigte nicht etwa einen basischen, sondern einen sauren Charakter; es war in verdünntem Alkali leicht löslich und daraus durch Säurezusatz in braunen Flocken fällbar. Unsere Hoffnung, von dem Reduktionsprodukte aus auf dem Wege der Diazotierung zu einem farblosen Derivate zu gelangen, ging nicht in Erfüllung.

Die Versuche, durch Erhitzen der Nitroprodukte mit Salpetersäure im Einschlußrohre einen weiteren Abbau zu erzielen, scheiterten daran, daß keine unserer Röhren den großen bei der Reaktion auftretenden Druck auszuhalten vermochte.

Was nun die Natur der Nitroprodukte betrifft, so lehrt ein Blick auf die Tabelle, daß von einer chemischen Einheitlichkeit derselben keine Rede sein kann. Es handelt sich vielmehr um Gemenge in verschiedenem Grade nitrierter und oxydierter Derivate unserer Kohlenwasserstoffe. Will man dieselben auf einen Komplex mit 17 Kohlenstoffatomen beziehen, so gruppieren sie sich etwa um die aus den Mittelwerten berechnete

Nitro-

Nr.	Darstellung des Präparates	Analyse			
1	5 g reiner Cholsäure (4 mal umkrystallisiert) bei Gegenwart von 10 g P_2O_5 trocken destilliert, Öl in heißer rauchender HNO_3 gelöst. Lösung mit H_2O gefällt. Produkt in Chloroform gelöst, mit Petroläther gefällt. Im Vakuum getrocknet.	C 51,19%			
		H 4,16 „			
		N 9,09 „			
		O 35,56 „			
		100,—%			
2	5 g reiner krystallisierter Biliansäure bei Gegenwart von 10 g Eisenfeilspänen destilliert. Öl wie in 1 behandelt, Nitroprodukt überdies in NaOH gelöst, mit HCl gefällt.	C 48,09%			
		H 4,19 „			
		N 9,78 „			
		O 37,94 „			
		100,—%			
3	Destillationsprodukt aus Biliansäure 5 Tage lang mit überhitztem Wasserdampf behandelt, der nicht flüchtige Anteil wie oben nitriert und weiterbehandelt.	C 54,44	54,30		54,37%
		H 4,21	4,06		4,14 „
		N 8,33	8,14		8,24 „
		O			33,25 „
					100,—%
4	Destillationsprodukt aus Cholsäure. Wie 3. Nitroprodukt in NH_3 gelöst, NH_3-Überschuß am Wasserbade vertrieben, Rückstand in H_2O gelöst, mit $AgNO_3$ gefällt, Ag-frei gewaschen, im Vakuum getrocknet.	C 36,82	36,52		36,67%
		H 3,27	3,07		3,17 „
		N 6,44	6,79		6,61 „
		Ag 35,19	34,81		35,00 „
					18,55 „
					100,—%
5	Destillationsprodukt aus Biliansäure. Wie 4.	C 35,83	36,14		35,98%
		H 2,60	2,55		2,57 „
		N 5,80	5,84		5,82 „
		Ag 36,85			36,85 „
					18,78 „
					100,—%
6	Die in Versuch 4 und 5 durch Eingießen in H_2O erhaltenen Filtrate durch Eindampfen von HNO_3 befreit, Rückstand in H_2O gelöst. Kleine Menge Oxalsäure als Calciumoxalat beseitigt, Nitroprodukt in Amylalkohol, aus diesem die verdünnte NH_3 übergeführt, sodann in Silbersalz umgewandelt.	C 31,16	31,23		31,20%
		H 2,52	2,54		2,53 „
		N 2,65	2,79		2,72 „
		O 42,56	42,95	42,72	42,74 „
					20,81 „
					100,—%

Formel $C_{17}H_{18}(NO_2)_2O_3$, während, wenn man als extremen Fall den 12 C-Komplex heranzieht, die Formel $C_{12}H_{12}(NO_2)_2O_2$ gewissermaßen als Paradigma gelten kann.

Man wird aus der Betrachtung dieser Produkte wohl kaum mehr als die Tatsache ableiten können, daß unser

körper.

Atomrelation des Silbersalzes	Atomrelation der freien Säure
	$C_1H_{0.977}N_{0.151}O_{0.521}$
	$C_1H_{1.038}N_{0.174}O_{0.591}$
	$C_1H_{0.906}N_{0.130}N_{0.459}$
$C_1H_{1.025}N_{0.154}Ag_{0.106}O_{0.379}$	$C_1H_{1.131}N_{0.154}O_{0.379}$
$C_1H_{0.850}N_{0.138}Ag_{0.113}O_{0.391}$	$C_1H_{0.963}N_{0.138}O_{0.391}$
$C_1H_{0.965}N_{0.075}Ag_{0.152}O_{0.500}$	$C_1H_{1.147}N_{0.075}O_{0.500}$
Mittel:	$C_1H_{1.027}N_{0.137}O_{0.473} =$ $C_1H_{1.027}(NO_2)_{0.137}O_{0.199} = C_{12}H_{12.32}(NO_2)_{1.64}O_{2.39}$ $= C_{17}H_{17.46}(NO_2)_{2.33}O_{3.38}$

Kohlenwasserstoff unter der Einwirkung der Salpetersäure eine partielle Dehydrierung und eine Oxydation erfahren und dabei gleichzeitig einen Teil seines Wasserstoffes gegen Nitrogruppen ausgetauscht hat. Die Annahme einer Ringsprengung unter Carboxyl-

neubildung ist dabei nicht unerläßlich; der saure Charakter der Verbindungen kann durch die Koexistenz von Nitro- und Phenolgruppen ausreichend erklärt werden.

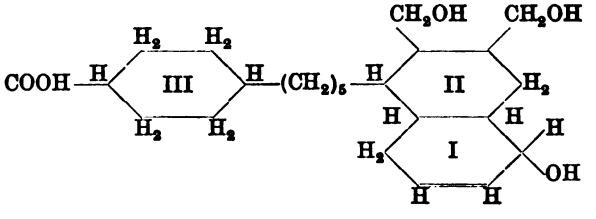
VI. Diskussion der Versuchsergebnisse auf Grund der Preglschen Annahme für die Konstitution der Cholsäure.

Wenn wir nunmehr versuchen wollen, uns über die Schlußfolgerungen klar zu werden, die sich aus unseren Beobachtungen hinsichtlich der Konstitution der Cholsäure ergeben, glauben wir, daß es wenig Nutzen brächte, die sehr zahlreichen, sich hier ergebenden theoretischen Möglichkeiten, eingehend zu erörtern.

Wir glauben vielmehr, daß wir sowohl den logischen als auch den praktischen Gesichtspunkten besser entsprechen dürften, wenn wir uns darauf beschränken, an jene Vorstellungen hinsichtlich der Konstitution der Cholsäure unmittelbar anzuknüpfen, die der Gesamtheit des bisher vorliegenden, sehr umfangreichen Versuchsmaterials am besten Rechnung tragen.

Pregl[1]) hat ganz kürzlich in einer vortrefflichen Untersuchung die Schlußfolgerungen, die sich aus seinen eigenen Versuchen sowie aus den wichtigen neuen einschlägigen Arbeiten von Panzer[2]), Letsche[3]), Langheld[4]) und Schrötter[5]) ergaben, in folgender Art zusammengefaßt:

„Als einfachste Vorstellung für die Konstitution der Cholalsäure ergibt sich eines der beiden nachstehenden Formelbilder, in denen die Stellung der Substituenten und der doppelten Bindungen ganz willkürlich gewählt ist:



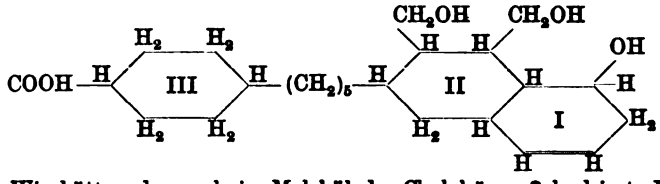
[1]) l. c., Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 167 ff.; vgl. Pflügers Archiv 71, 307, 1898 und Sitzungsber. d. Wien. Akad. 111, Abt. IIb, 1902.

[2]) Th. Panzer, Über Latschinoffs Cholekampfersäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 181; Energische Oxydation der Cholsäure mit Salpetersäure. Ibid. 60, 376.

[3]) F. Letsche, Abbau der Cholsäure durch Oxydation. Ibid. 61, 215.

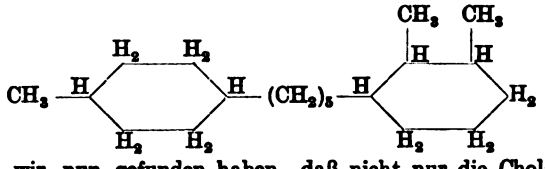
[4]) Langheld, Über das Verhalten der Cholsäure gegen Ozon. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1023.

[5]) H. Schrötter, Monatsh. f. Chem. 25, 245, 395, 749.



Wir hätten demnach im Molekül der Cholalsäure 3 hydrierte Ringsysteme, von denen das mit I bezeichnete lediglich erschlossen ist, während Ring II durch Schrötter zum mindesten wahrscheinlich gemacht, Ring III hingegen von Panzer experimentell bewiesen worden ist."

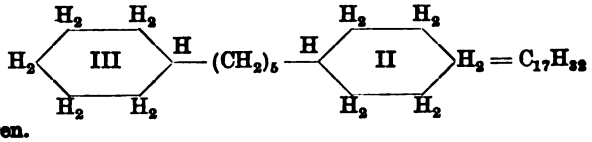
Pregl nimmt an, daß bei der Bildung von Ciliansäure $C_{20}H_{28}O_8$ aus Biliansäure $C_{24}H_{34}O_8$ aus einem Körper mit 3 hydrierten Ringsystemen ein solcher mit nur 2 Ringsystemen hervorgeht, und daß dem Grundkohlenwasserstoff der Ciliansäure $C_{20}H_{38}$ folgende Formel (in der die Stellung der CH_3-Gruppen willkürlich ist) zukommt:



Da wir nun gefunden haben, daß nicht nur die Cholalsäure und die Biliansäure, sondern auch die Ciliansäure bei trockener Destillation den charakteristischen Kohlenwasserstoff liefert, muß man im Sinne obiger Vorstellung annehmen, daß das Zweiringsystem der Ciliansäure alle jene Elemente enthält, die zur Bildung jenes Kohlenwasserstoffes erforderlich sind.

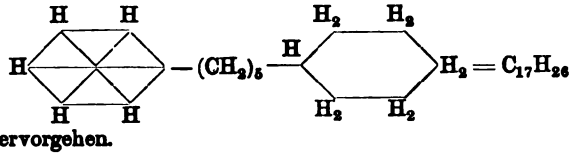
Es ist nun eine naheliegende und plausible Vorstellung, daß bei trockener Destillation der Ciliansäure die (im obigen Schema durch CH_3-Gruppen vertreten) 3 Carboxyle abgesprengt und die beiden Carbonylgruppen reduziert werden.

In diesem Falle würde der gesättigte Kohlenwasserstoff



resultieren.

Nimmt man jedoch weiter an, daß bei der trockenen Destillation eine totale Dehydrierung des Panzerschen Ringes (III) vor sich gegangen ist (analog wie Pregl eine solche beim Übergange der Choloidansäure in Brenzcholoidansäure beim Schmelzen der ersteren annimmt), so würde der Kohlenwasserstoff



daraus hervorgehen.

Übersichts-

	Gefunden in %								
Flüchtiges Öl	A.	B_I.				B_{II}.			C.
	C 84,05	89,57	89,49	89,31	89,25	89,40	89,53	90,36	89,91
	H 10,47	10,24	10,21	10,03	10,24	10,18	10,36	10,35	10,08
	99,52					99,58	99,89	100,71	99,99
		A.				B.			
	M =	165	196	217		160	178	175	214
	Halogenaddition		1 g addiert		0,328	0,457 g Br			
					0,727	0,711 g J			
	Spezifische Refraktion $R = \frac{n^2-1}{n^2+2} \cdot \frac{1}{d}$				0,3259, 0,3258, 0,3184, 0,3216, 0,3177				
Wachsartiges Destillationsprodukt		A.			B.				
	C 76,41 %	76,24 %			76,32 %	76,60 %			
	H 11,04	10,89			10,97	10,40			
	O				12,71	13,00			
					100,—	100,—			
		M = 212				254			
		C.							
	C 78,65 %	78,25 %			78,45 %				
	H 10,00	9,97			9,98				
	O				11,57				
					100,—				
		M = 253							
Oxydation mit Permanganat	C 27,77 %	27,77 %			27,77 %				
	H 3,39	3,42			3,40				
	Hg 55,49	55,06			55,27				
	O				13,56				
					100,—				
Oxydation mit Salpetersäure	I. $C_1H_{0.977}N_{0.151}O_{0.521}$								
	II. $C_1H_{1.038}N_{0.174}O_{0.591}$								
	III. $C_1H_{0.906}N_{0.130}O_{0.459}$								
	IV. $C_1H_{1.131}N_{0.154}O_{0.379}$								
	V. $C_1H_{0.963}N_{0.138}O_{0.391}$								
	VI. $C_1H_{1.147}N_{0.075}O_{0.500}$								
	$C_1H_{1.027}(NO_2)_{0.137}O_{0.199}$								

Nun kann es sich, wie ein Blick auf die obenstehende Übersichtstabelle unserer Analysenresultate lehrt, keinesfalls um den Kohlenwasserstoff $C_{17}H_{26}$ handeln; wohl aber kommen die Kohlenwasserstoffe $C_{17}H_{24}$ und $C_{17}H_{22}$ in Betracht, und zwar würden die Wasserstoffzahlen eher zugunsten des letzteren sprechen. Die Bestimmungen der Molekularrefraktion haben das Vorhandensein von 3 doppelten Bindungen ergeben, und die Bestimmungen der Halogenaddition haben weiterhin

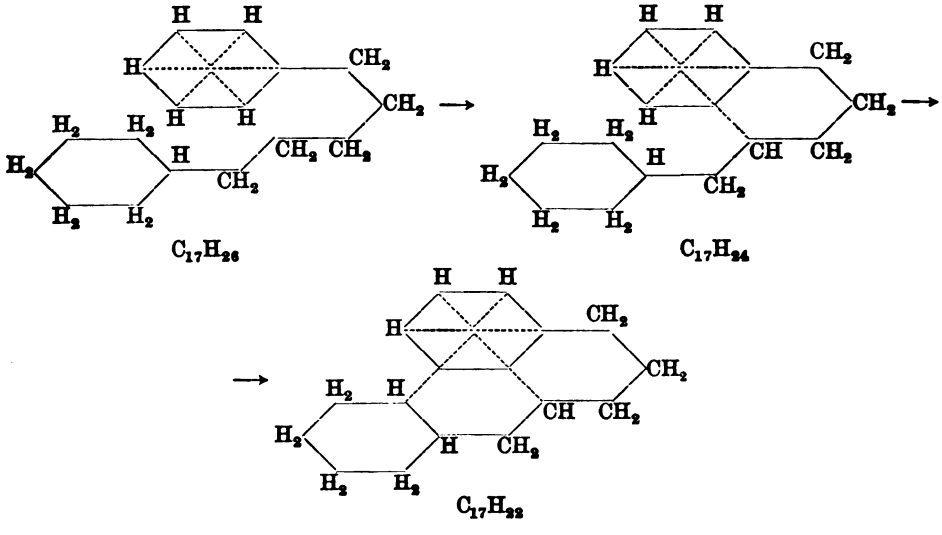
Tabelle.

Berechnet für		
$C_{17}H_{24}$ in %	$C_{17}H_{22}$ in %	$C_{12}H_{16}$ in %
Kohlenwasserstoff $C_{17}H_{24}$: C 89,48, H 10,52, 100,—; M = 228; $C_{17}H_{23}Br$: 1 g Öl → 0,351 g Br; $C_{17}H_{23}J$: 1 g Öl → 0,557 g J; 3 Doppelbindungen + 3 Ringschlüsse; $R = \frac{MR}{M} = 0{,}3196$	Kohlenwasserstoff $C_{17}H_{22}$: C 90,26, H 9,74, 100,—; M = 226; $C_{17}H_{21}Br$: 1 g Öl → 0,35 Br; $C_{17}H_{21}J$: 1 g Öl → 0,562 J; 3 Doppelbindungen + 4 Ringschlüsse; $R = \frac{MR}{M} = 0{,}3131$	Kohlenwasserstoff $C_{12}H_{16}$: C 90,00, H 10,00, 100,—; M = 160; $C_{12}H_{15}Br$: 1 g Öl → 0,500 Br; $C_{12}H_{15}J$: 1 g Öl → 0,793 J; 3 Doppelbindungen + 2 Ringschlüsse; $R = \frac{MR}{M} = 0{,}3247$
$C_{17}H_{28}O_2$: C 77,27 %, H 10,61, O 12,12, 100,—; M = 264 $C_{17}H_{24}O_2$: C 78,46 %, H 9,23, O 12,31, 100,—; M = 260		
$C_{17}H_{24}Hg_2O_6$: C 28,18 %, H 3,31, Hg 55,24, O 13,27, 100,—	$C_{17}H_{22}Hg_2O_6$: C 28,26 %, H 3,04, Hg 55,40, O 13,10, 100,—	$2C_{12}H_{16}O_3 \cdot 3HgO$: C 27,07 %, H 3,00, Hg 56,39, O 13,54, 100,—
$C_{17}H_{18}(NO_2)_2O_3$: $C_1H_{1.058}(NO_2)_{0.117}O_{0.176}$		$C_{12}H_{12}(NO_2)_2O_2$: $C_1H_1(NO_2)_{0.166}O_{0.166}$

gelehrt, daß es sich keinesfalls um aliphatische doppelte Bindungen handle, sondern vielmehr um solche, die in einem cyclischen Komplex maskiert sind. Da nun der entsprechende Grundkohlenwasserstoff $C_{17}H_{36}$ ist, enthält der Kohlenwasserstoff $C_{17}H_{24}$ ein Minus von 12 H, der Kohlenwasserstoff $C_{17}H_{22}$ ein Minus von 14 H. Da nur 6 H auf Rechnung der doppelten Bindungen kommen, resultiert das Vorhandensein von 3 Ringbildungen im ersteren, von 4 Ringbildungen in letzterem Falle;

Könnte nun die Neubildung eines Dreiring- bzw. Vierringsystems bei der trockenen Destillation der Ciliansäure aus dem Zweiringsystem dieser letzteren mit der Preglschen Vorstellung in Einklang gebracht werden?

Wir glauben diese Frage bejahen zu dürfen, wobei wir aus einer großen Zahl von Möglichkeiten deren zwei herausgreifen und im nachfolgenden Schema veranschaulichen:



Wir sind — und dies sei, um Mißverständnissen vorzubeugen, nachdrücklich betont — weit davon entfernt, zu behaupten, daß der Vorgang sich tatsächlich in der angegebenen Art abspielt. Denn, abgesehen davon, daß die ganze Vorstellung auf einer vorläufig noch hypothetischen Annahme über die Konstitution der Cholsäure basiert, liegt es ja auf der Hand, daß Ringschlüsse und doppelte Bindungen noch in der mannigfachsten Art zustande kommen könnten, daß die Bildung von Drei-, Vier- und Fünfringen denkbar wäre usw. und daß nur dann, wenn man etwa auf synthetischem Wege Substanzen von ähnlicher Konstitution erhalten und mit dem Cholsäurederivat übereinstimmend gefunden hätte, eine bestimmtere Behauptung am Platze wäre.

Das Schema soll nichts anderes veranschaulichen als das Bestehen der Möglichkeit, unsere experimentellen Befunde mit den Anschauungen Pregls in Einklang zu bringen.

Wir möchten jedoch auch noch auf eine andere Möglichkeit hinweisen: daß nämlich hier einer jener Fälle vorliegen könnte, wo sich bei Berechnung der Molekularrefraktion aus der Summe der Atomrefraktionen Theorie und Praxis nicht decken, derart daß nicht, wie angenommen, 3 doppelte Bindungen, sondern dennoch deren mehrere, und zwar 4 oder 5 existieren und man demnach mit der einfachen Annahme eines partiell hydrierten Diphenylpentanderivates auskäme

(Diphenylpentan = $C_{17}H_{20}$), die einer direkten Prüfung durch die Synthese nicht allzu schwer zugänglich wäre.[1])

Man wird die hier vorliegenden Schwierigkeiten richtiger einschätzen, wenn man sich vergegenwärtigt, daß unser Kohlenwasserstoff trotz der leidlichen Übereinstimmung der analytischen Befunde von Präparaten verschiedener Provenienz in streng chemischem Sinne nicht als einheitlich angesehen werden kann, infolge der unvermeidlichen Verharzung vielmehr als ein Gemenge des ursprünglichen Kohlenwasserstoffs und seiner bei der Verharzung auftretenden Modifikationen angesehen werden muß.

Die Annahme, daß unserem Kohlenwasserstoffe ein Komplex von 17 Kohlenstoffatomen zugrunde liegt, findet in der Analyse und Molekulargewichtsbestimmung der wachsartigen Destillationsprodukte eine unmittelbare Stütze. Die Feststellung, daß dieselben 2 Sauerstoffatome im Moleküle enthalten, schränkt hier die Anzahl der vorhandenen Möglichkeiten wesentlich ein und deutet auf das Vorhandensein eines Komplexes mit 16 bis 18 Kohlenstoffatomen direkt hin. Die Annahme, daß die wachsartigen Destillationsprodukte die 17 Kohlenstoffatome eines hydrierten Diphenylpentankomplexes in sich schließen, hätte den Vorzug besonderer Einfachheit und würde ihre Auffassung als labile Vorstufen des Kohlenwasserstoffes, in den sie durch Abspaltung von O- und H-Atomen ohne Änderung des Kohlenstoffskelettes übergehen könnten, in befriedigender Weise Rechnung tragen.

Eine weitere Stütze findet die Annahme eines hydrierten Diphenylpentankomplexes in der Analyse der Quecksilberverbindung eines durch Permanganateinwirkung erhaltenen Oxydationsproduktes. Die Berechnung derselben ergibt eine Relation $Hg_1 : C_{8^1/_2}$ und leitet direkt zu einer Formel $C_{17}H_{24}Hg_2O_6$ oder $C_{17}H_{22}Hg_2O_6$ hin, die wohl derart zu deuten wäre, daß die beiden Hg-Atome nicht von Carboxylen sondern von phenolartigen Hydroxylen getragen werden.

Was schließlich die Nitrokörper betrifft, die durch Einwirkung starker Salpetersäure auf unsere Destillationsprodukte entstanden sind, würden sich dieselben gleichfalls unschwer unserem Schema einfügen. Man könnte dieselben so deuten, daß der hydrierte Diphenylpentankomplex durch die Wirkung der Salpetersäure dehydriert, 2 bis 3fach nitriert und mehrfach oxydiert worden sei (wobei die Oxydation bei der Bildung von Phenolgruppen stehen bleiben oder bis zur Bildung von Carbonylgruppen weiter gehen könnte) z. B.

$$C_{17}H_{22} \longrightarrow C_{17}H_{20} \longrightarrow C_{17}H_{17}(NO_2)_3O_4 \text{ oder } C_{17}H_{18}(NO_2)_2O_3 \text{ usw.}$$

Das Oxydationsprodukt würde also in diesem Falle seinen ausgesprochen saueren Charakter, der es befähigt, mehrere Atome eines einwertigen Metalles zu binden, nicht der Gegenwart von Carboxylen

[1]) Vgl. hinsichtlich der Synthese von Diphenylpentanderivaten: V. Meyer & Jacobson, Lehrb. d. organ. Chem. 2, 2. Teil, 278, und die analoge Synthese des Diphenylbutans (ibd. S. 267).

sondern dem Nebeneinander von Nitrogruppen und Hydroxylen (wie dies z. B. in der Pikrinsäure der Fall ist) verdanken, es wäre denn, daß man die Sprengung des Ringes II und die Neubildung von Carboxylkomplexen annehmen wollte.

Wie früher auseinander gesetzt worden ist, liegen noch eine ganze Reihe von Kohlenwasserstoffen wie $C_{12}H_{16}$, $C_{13}H_{18}$, $C_{14}H_{18}$, $C_{15}H_{20}$, $C_{16}H_{22}$ innerhalb des Bereiches unserer Elementaranalysen und Molekulargewichtsbestimmungen. Es dürfte genügen, um das Anfangsglied dieser Reihe $C_{12}H_{16}$ noch kurz zu diskutieren.

Ein Blick auf die Übersichtstabelle lehrt, daß hier gefundene und berechnete Werte ebensogut wie bei der früheren Annahme harmonieren. In bezug auf das Halogenadditionsvermögen herrscht hier sogar bessere Übereinstimmung. Da die Molekularrefraktion auf 3 Doppelbindungen hinweist, wäre hier die Annahme eines Zweiringsystems nötig.

Ist die Annahme eines mit 2 Ringschließen ausgestalteten Kohlenwasserstoffes $C_{12}H_{16}$ oder $C_{13}H_{18}$ mit der Preglschen Vorstellung unvereinbar? Wir glauben, daß dies nicht unbedingt der Fall sein muß. Pregl hält den Kohlenwasserstoff, den Panzer bei Natronkalkdestillation der Cholecamphersäure (Choloidansäure) erhalten hat, für Normalheptylbenzol $C_{13}H_{20}$, und wir brauchten hier nur einen sekundären Ringschluß anzunehmen, um aus dem analog abgeleiteten Hexylbenzol $C_{12}H_{18}$ den Kohlenwasserstoff $C_{12}H_{16}$ oder aus $C_{13}H_{20}$ den Kohlenwasserstoff $C_{13}H_{18}$ abzuleiten.

Wesentlich schwieriger würde sich in diesem Falle die Deutung eines Zusammenhanges mit den wachsartigen Destillationsprodukten gestalten und auch die Deutung des Permanganat-Oxydationsproduktes würde komplizierte Annahmen erfordern (etwa $2\,C_{12}H_{16}O_6 \cdot 3\,HgO$). Es lehrt ferner eine einfache Rechnung, daß die Ausbeute an Kohlenwasserstoff in diesem Falle bestenfalls 42% der Cholsäure betragen könnte, während die Ausbeute an Rohöl tatsächlich weit mehr als die Hälfte betragen kann. Man wird so zu der Vorstellung, es handle sich um einen Komplex mit 17 Kohlenstoffatomen, immer wieder hingedrängt.

Eine definitive Klärung der Sachlage ist wohl erst dann zu erwarten, wenn es gelungen sein wird, krystallisierte Derivate unserer Kohlenwasserstoffe zu gewinnen oder die Zahl der in Betracht kommenden Möglichkeiten auf dem Wege des synthetischen Experimentes einzuschränken.

Vorläufig glauben wir uns mit der Feststellung begnügen zu sollen, daß die Gesamtheit unserer Beobachtungen keinerlei Tatsachen zutage gefördert hat, die mit der Preglschen Annahme durchaus unvereinbar wären.

Zusammenfassung.

1. Bei der trockenen Destillation der Cholsäure und der Biliansäure treten identische Produkte auf, und zwar einerseits

solche von öliger, andererseits solche von wachsartiger Beschaffenheit.

2. Der aus dem öligen Destillationsprodukte durch überhitzten Wasserdampf isolierbare flüchtige Anteil ist ein Kohlenwasserstoff, der außerordentlich leicht der Verharzung unterliegt und selbst im Kathodenvakuum nicht unzersetzt destilliert werden kann. Demselben kommt nicht die ihm von Destrem zugeschriebene Formel $C_{24}H_{32}$, vielmehr (wie Molekulargewichtsbestimmungen in siedendem Eisessig, Chloroform und Aceton, sowie Gefrierpunktsbestimmungen in Eisessig lehren) ein niederes Molekulargewicht zu, und zwar handelt es sich um einen Verband von 12 bis 17 Kohlenstoffatomen.

3. Die Berechnung der Molekularrefraktion aus dem Brechungsindex, der Dichte und dem Molekulargewichte deutet auf das Vorhandensein von 3 doppelten Bindungen hin. Dieselben sind, wie Versuche der Addition von Brom und Jod lehrten, nicht aliphatischer Natur, vielmehr in einem cyclischen Komplex enthaltene, „maskierte" Bindungen. Die Halogenaufnahme entspricht annähernd der Substitution von einem Atom Halogen pro Molekül.

4. Die neben der Hauptmenge der obigen Destillationsprodukte in nur geringen Mengen auftretenden wachsartigen Destillationsprodukte sind sauerstoffhaltige Substanzen. Die Zusammensetzung derselben entspricht den Formeln $C_{17}H_{28}O_2$, bzw. $C_{17}H_{24}O_2$ oder aber analogen Ausdrücken mit 18 oder 16 Kohlenstoffen. Dieselben sind anscheinend labile, nur während der ersten Stadien des Destillationsprozesses auftretende Vorstufen des vorerwähnten Kohlenwasserstoffes.

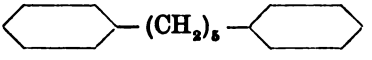
5. Der Kohlenwasserstoff wird durch Oxydation mit Permanganat in alkalischer Lösung in ein Produkt von saurem Charakter übergeführt, dessen Quecksilbersalz annähernd der Zusammensetzung $C_{17}H_{24}Hg_2O_6$, bzw. $C_{17}H_{22}Hg_2O_6$ oder einer verwandten Formel entspricht.

6. Durch Behandlung der öligen Destillationsprodukte mit Salpetersäure wurden amorphe Nitrokörper von saurem Charakter erhalten, die selbst gegen die heiße rauchende Salpetersäure resistent sind und aus dem ursprünglichen Kohlen-

wasserstoffe durch Dehydrierung, Eintritt von 2 bis 3 Nitrogruppen und weitere Aufnahme mehrerer Sauerstoffatome abgeleitet werden können.

7. Die Ciliansäure $C_{20}H_{28}O_3$, die aus der Biliansäure unter Verlust von 4 C-Atomen hervorgeht und nach Pregl als ein Körper mit nur 2 hydrierten Ringsystemen aufzufassen ist, liefert bei der trockenen Destillation allem Anscheine nach denselben Kohlenwasserstoff wie die Cholsäure und die Biliansäure. Der Bildung dieses Kohlenwasserstoffes dürfte sonach ein hydriertes Zweiringsystem zugrunde liegen.

8. Die Richtigkeit der von Pregl für die Konstitution der Cholsäure entwickelten Anschauungen vorausgesetzt, würde sich Verhalten und Beschaffenheit des Kohlenwasserstoffes wohl am ungezwungensten durch die Annahme deuten lassen, daß demselben die Formel $C_{17}H_{24}$ oder $C_{17}H_{22}$ zukomme und daß sich derselbe aus dem der Ciliansäure zugrunde liegenden hydrierten Diphenylpentankomplex



durch partielle Dehydrierung bzw. durch sekundäre Bildung eines Drei- oder Vierringsystemes ableite. Die Annahme, daß dem Kohlenwasserstoffe ein kleineres Molekulargewicht (z. B. entsprechend $C_{12}H_{16}$ oder $C_{13}H_{18}$) zukomme, erscheint weniger wahrscheinlich, ohne ganz ausgeschlossen werden zu können.

9. Die Gesamtheit der vorliegenden Beobachtungen hat keinerlei Tatsachen zutage gefördert, die mit der Preglschen Vorstellung hinsichtlich der Konstitution der Cholsäure unvereinbar wären, bietet jedoch auch noch anderen Möglichkeiten Raum.

Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente.

Von

O. v. Fürth und M. Friedmann, Wien.

(Eingegangen am 9. Mai 1910.)

Gelegentlich einer die Desamidierungsvorgänge im Tierkörper betreffenden, im Laboratorium F. Hofmeisters ausgeführten Untersuchung hat S. Lang[1]) darauf hingewiesen, daß sich der Zerfall der Amide von Aminosäuren (Asparagin und Glutamin) im tierischen Organismus mit der größten Leichtigkeit vollzieht, und daß diese Amide bei antiseptisch durchgeführten Versuchen einem autolysierenden Organbrei zugesetzt, allmählich ihren gesamten Amidstickstoff abspalten. Die weite Verbreitung von amidspaltenden Fermenten im Pflanzenreiche ist durch die Untersuchungen von Shibata[2]), Castoro[3]), Pringsheim[4]), Butkewitsch[5]), Kiesel[6]) u. a. sichergestellt worden.

Die naheliegende Vorstellung, daß wir es hier nur mit einem speziellen Falle von tryptischer Enzymwirkung zu tun haben, wird durch den von Schwarzschild[7]) erbrachten Nachweis widerlegt, demzufolge das Trypsin nicht imstande ist, aus Asparagin Ammoniak abzuspalten. Eine andere Frage dagegen ist die, ob die asparaginspaltenden Fermente zu den autolytischen Gewebsfermenten und zu den Organ-

---

[1]) S. Lang, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 320, 1904.

[2]) K. Shibata, Ibidem 5, 385, 1904.

[3]) N. Castoro, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 525, 1909.

[4]) H. Pringsheim, diese Zeitschr. 12, 15, 1908.

[5]) W. Butkewitsch, diese Zeitschr. 16, 410, 1909.

[6]) A. Kiesel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 60, 476, 1909.

[7]) M. Schwarzschild, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 158, 1904.

Nr.	Versuchsmodus	Leber	Milz	Niere
1	Organe vom Schweine mit physiol. NaCl autolysiert. Asparaginzusatz 0,62 g. 3tägige Autolyse.	48,0 − 31,9 = 16,1	19,5 − 9,0 = 10,5	44,1 − 12,1 = **32,0**
2	Organe vom Schweine. Je 50 g Organbrei + 100 ccm NaCl 0,9% + Asparagin. 4tägige Autolyse.	62,0 − 36,0 = 26,0	42 − 25 = 17	63,7 − 19,5 = **44,2**
3	Organe vom Pferde. Je 50 g Organbrei + 100 ccm NaCl 0,9% + Asparagin ca. 0,5 g. — 4tägige Autolyse.	85,1 − 45,0 = 40,1	62,1 − 47,4 = 14,7	71,8 − 36,3 = **35,5**
4	Organe vom Pferde. Je 50 g Organbrei + 100 ccm NaCl 0,9% + {80 ccm Asparagin 0,74% oder 80 ccm H_2O} oder 6tägige Autolyse.	71,5 − 34,0 = 37,5	60,8 − 34,6 = 26,2	70,0 / 72,5 } 71,2 — 40,0 / 37,0 } 38,5 = **32,7**
5	Wie 4, jedoch Ammoniakbestimmung nach Boßhard.	51,1 − 26,9 = 24,2		47,9 − 28,1 = **19,8**
6	Organe vom Pferd. Autolyse unter Chloroformzusatz. Asparaginzusatz ca. 0,5 g.	31,5 − 12,2 = 19,3		36,5 − 14,1 = **22,4**

erepsinen in unmittelbarer Beziehung stehen. Der Wunsch, dieser Frage und damit zugleich dem Probleme der fermentativen Verarbeitung der Eiweißbruchstücke in den Geweben näher zu treten, hat uns dazu geführt, uns mit der Verbreitung dieser Fermente näher zu befassen und uns zunächst die Frage vorzulegen, ob das Vermögen der Asparaginspaltung allen Geweben annähernd gleichmäßig zukomme, sonach eine allgemeine Eigenschaft der tierischen Zelle sei, oder ob aber irgendeine Gewebsform hinsichtlich dieses Vermögens in auffallender Art bevorzugt sei.

Wir haben zunächst, um uns über den Wirkungsmodus der asparaginspaltenden Fermente einigermaßen zu orientieren, einige Versuche mit autolysierter Hefe vorgenommen.

a) 50 g obergäriger Brauereihefe wurden in 500 ccm Wasser suspendiert, unter Zusatz von 30 ccm normaler Sodalösung und etwas Toluol 3 Tage lang der Autolyse überlassen, sodann filtriert. Von dem klaren

Lunge	Skelettmuskel	Herzmuskel	Darmschleimhaut	Hirn
37,0 − 11,6 = 25,4	71,2 − 16,2 = 55,0			
43,7 − 13,6 = 30,1		28,8 − 12,6 = 16,2	114,7 − 50,9 = 63,8	64,5 − 28,7 = 35,8
47,6 − 20,7 = 26,9			84,6 − 37,6 = 47,0	34,2 − 14,9 = 19,3
	22,0 − 12,2 = 9,8		53,7 / 55,5 } 54,6 − 25,9 = 28,7 47,4 − 9,6 = 37,8	

Filtrate wurden abgemessene toluolhaltige Proben mit und ohne Zusatz von Asparagin auf weitere 3 Tage in den Brutschrank gestellt und die abgespaltene Ammoniakmenge sodann durch Destillation mit Magnesia bestimmt. 50 ccm Filtrat ohne Zusatz lieferten 0,0049 g NH_3-N; 50 ccm Filtrat, denen 0,5 g Asparagin zugesetzt worden waren, lieferten 0,0392 g NH_3-N. Auf Rechnung des Asparagins kommen sonach 0,0392 — 0,0049 = 0,0343 g NH_3-N; dies entspricht, da das zugesetzte Asparagin 0,0467 g Amid-N enthielt, etwa $^3/_4$ des in lockerer Bindung vorhandenen Asparagin-N.

b) Analoger Versuch.

50 ccm des Hefefiltrates gaben nach 5tägiger Toluolanalyse ohne Zusatz 0,0048 / 0,0031 } 0,0038 g NH_3-N, mit Zusatz von 0,5 g Asparagin autolysiert 0,0245 / 0,0245 } 0,0245 g NH_3-N; eine gekochte Kontrollprobe 0,0021 g. Auf Rechnung des Asparagins kommt sonach 0,0245 — 0,0038 = 0,0207 g NH_3-N, was etwas weniger als der Hälfte des im zugesetzten Asparagin enthaltenen Amid-N entspricht.

Analoge Versuche, wo an Stelle des Asparagins Alanin bzw. Acetamid zugesetzt worden war, ergaben nur minimale NH_3-Bildung. Es war sonach in dem Hefenfiltrate die Gegenwart eines Fermentes sichergestellt worden, das den Amid-N des Asparagins mit Leichtigkeit abzuspalten vermochte, dem Amid-Stickstoff des Acetamids gegenüber jedoch ebenso unwirksam war, wie gegenüber dem Aminosäuren-Stickstoff des Alanins.

Was nun unsere Versuchsmethodik bei den Organbreiversuchen betrifft, hielten wir uns dabei im allgemeinen genau an den von S. Lang[1]) beschriebenen Vorgang, indem wir nach Abschluß der antiseptischen, mit oder ohne Asparaginzusatz durchgeführten Autolyse die abgespaltene Ammoniakmenge nach Enteiweißung durch Tannin durch Magnesiadestillation bestimmten (nur mit der Abweichung, daß wir bei gewöhnlichem Drucke destillierten).

Zweifellos wird das Asparagin bereits durch Kochen mit Magnesia langsam zersetzt; wir haben uns jedoch durch Kontrollversuche überzeugt, daß diese Abspaltung so langsam vor sich geht, daß sie für unsere Zwecke praktisch vernachlässigt werden konnte.

Wir haben jedoch in einigen unserer späteren Versuche, um diese Fehlerquelle ganz auszuschalten, der Empfehlung Castoros[2]) entsprechend, in dem enteiweißten Filtrate das Ammoniak durch Phosphorwolframsäure nach dem Vorgange von Boßhard[3]) gefällt und so vom Asparagin getrennt und den filtrierten und gewaschenen Phosphorwolframsäureniederschlag der Magnesiadestillation unterworfen.

Mit Rücksicht auf die kürzlich von Salkowski und Kikkoji[4]) gegen die Anwendung des Toluols bei Autolysenversuchen geltend gemachten Bedenken haben wir gelegentlich dieses Antisepticum durch Chloroform unter Einhaltung der Vorschriften Salkowskis ersetzt, ohne daß dies einen merklichen Einfluß auf die Versuchsresultate geübt hätte. Die bei Organbreiversuchen ja zweifellos stets vorhandene Gefahr einer bakteriellen Infektion suchten wir durch sorgfältige Zerkleinerung der Organe hintanzuhalten und so ein gleichmäßiges Eindringen des Antisepticums in die Partikelchen der Organsuspension zu erzielen.

Als Material für unsere Versuche dienten uns frisch aus dem Schlachthause bezogene, sorgfältig und gleichmäßig zer-

[1]) l. c. S. 323.

[2]) l. c.

[3]) Boßhard, Zeitschr. f. analyt. Chem. 22, 329, 1883.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 63, 109 und 136, 1909.

kleinerte Organe von Schweinen und Pferden, wobei darauf Wert gelegt wurde, daß alle Organe, die für einen Versuch bestimmt waren, von demselben Individuum stammten.

Wir geben nunmehr unsere Serienversuche, und zwar der Kürze wegen tabellarisch wieder. Die Zahlen bedeuten die gefundene Ammoniakmenge, ausgedrückt in Kubikzentimetern der bei der Titration verbrauchten $^n/_{10}$-Säure. Es wurden stets Parallelversuche mit und ohne Asparaginzusatz ausgeführt und die Differenzen der gefundenen Ammoniakwerte als Maß der stattgehabten Asparaginspaltung angesehen. Beispielsweise ist also die Zahlenangabe $28{,}8 - 12{,}6 = 16{,}2$ in unserer Tabelle so zu verstehen, daß die Organbreiprobe mit Asparaginzusatz nach Abschluß der Autolyse 28,8 ccm $^n/_{10}$-NH_3 geliefert hat, die Parallelprobe ohne Asparaginzusatz nur 12,6 ccm $^n/_{10}$-NH_3, derart, daß die Differenz $28{,}8 - 12{,}6 = 16{,}2$ ccm $^n/_{10}$-NH_3 ein Maß für die Intensität der stattgehabten Asparaginspaltung bildet.

Eine Durchsicht der Tabelle (siehe S. 436 u. 437) lehrt, daß eine Asparaginspaltung niemals vermißt wurde, sich vielmehr in allen Organen, und zwar in einem Ausmaße vollzieht, daß keinem derselben ohne weiteres eine überragende Ausnahmestellung eingeräumt werden kann. Auffallend ist es immerhin, daß in allen Versuchen, wo Darmschleimhaut zur Anwendung gelangte, die durch dieselbe bedingte Asparaginspaltung intensiver war als die durch ein anderes Organ bewirkte, und daß die Menge gebildeten Ammoniaks einigemal so groß war, daß dieselbe durch die Menge des im Asparagin enthaltenen locker gebundenen Amidstickstoffes nicht gedeckt werden kann, man vielmehr genötigt ist, eine partielle Abspaltung des festgebundenen Aminosäurestickstoffes im Sinne Jacobys[1]) anzunehmen, der bei der autolytischen Spaltung von Gewebseiweißkörpern ein viel reichlicheres Auftreten von Ammoniak und Säureamidstickstoff beobachtet hatte als bei der Säurehydrolyse. Im allgemeinen allerdings hielt sich die Ammoniakbildung in unseren Versuchen in solchen Grenzen, daß eine Abspaltung des Aminosäurenstickstoffes aus dem Asparagin nicht angenommen zu werden braucht. Auch bei abnormer

[1]) M. Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 149, 1900.

Steigerung der autolytischen Vorgänge in der Leber eines phosphorvergifteten Hundes vermochten wir bei einem ad hoc angestellten Versuche keine Desamidierung zugesetzten Alanins nachzuweisen. Wir glauben daher, daß diese aus der Reihe fallenden Befunde einer Nachprüfung unter bakteriologischer Kontrolle bedürftig wären.

Die Intensität, mit der die Darmschleimhaut beim autolytischen Versuche Asparagin zu spalten vermag, könnte zu dem von Vernon betonten Reichtum derselben an Erepsin in Parallele gesetzt werden, und es wäre verlockend, anzunehmen, daß wir hier einer sichtbaren Äußerung jener Kräfte gegenüberstehen, die beim physiologischen Abbau der resorbierten Gewebsproteide zur Geltung kommen. Bei nüchterner Betrachtung wird man aber eingestehen müssen, daß dergleichen Überlegungen entschieden für verfrüht gelten müssen, solange unsere Kenntnisse über fermentative Desamidierung in den Geweben nicht viel weiter gediehen sind, als dies heute der Fall ist.

Über den Einfluß langdauernder Nucleinsäurefütterung auf den Purinstoffwechsel und die Allantoinausscheidung beim Hunde.

Von

Waichi Hirokawa, Tokio.

(Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors Dr. Otto von Fürth im physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 9. Mai 1910.)

I. Einleitung.

Dank der mühevollen Arbeit zahlreicher Forscher hat im Verlaufe der letzten Dezennien die Frage des Abbaues der Nucleinstoffe im tierischen Organismus eine wesentliche Klärung erfahren. Insbesondere ist durch zahlreiche Fütterungsversuche mit nucleinreichem Gewebsmateriale, mit Nucleinen, Nucleinsäuren und Purinkörpern sowohl beim Menschen als beim Tiere der Weg, der von den Nucleinen zu den Nucleinsäuren, von diesen zu den Xanthinbasen und schließlich von da aus zur Harnsäure leitet, in seinen einzelnen Etappen ausreichend beleuchtet worden, derart, daß über den erwähnten Zusammenhang kein Zweifel mehr besteht.

Weit weniger Klarheit herrscht dagegen in bezug auf die Frage, welches das weitere Schicksal der Harnsäure im intermediären Stoffwechsel sei, insoweit dieselbe nicht als solche im Harne zur Ausscheidung gelangt. Nachdem vielfache Bemühungen, die Ausscheidung der Oxalsäure und des Glykokolls mit dem Harnsäurezerfall in Zusammenhang zu bringen, sich als wenig fruchtbar erwiesen hatten, ist diese Frage durch die Erkenntnis des Zusammenhanges zwischen Harnsäurezerfall und Allantoinbildung ihrer Lösung um ein gutes Stück näher gerückt worden.

Klarere Vorstellungen über die Rolle und Bedeutung des Allantoins im intermediären Stoffwechsel hatten jedoch die Möglichkeit, dieses Produkt in den Geweben und Exkreten quantitativ zu bestimmen, zur Voraussetzung. Daher war die erst vor 2 Jahren gelungene Lösung des Problems einer exakten quantitativen Allantoinbestimmung durch Wiechowski[1]) für die mit dem Purinstoffwechsel im Zusammenhang stehenden Fragen von großer Wichtigkeit.

Wiechowski sah einerseits, daß überlebende tierische Organe (Rinderniere, Hundeleber) Harnsäure quantitativ zu Allantoin zu oxydieren vermögen und bemerkte andererseits (in Übereinstimmung mit anderen Autoren), daß im Harne des Menschen und der darauf untersuchten Tiere (Hund, Katze, Kaninchen, Pferd und Affe) Allantoin nachweisbar ist. Weiterhin ergaben sich jedoch weitgehende Differenzen, insofern im Menschenharn unter normalen Verhältnissen nur wenig Allantoin zu finden ist, während z. B. im Hundeharn so große Allantoinmengen auftreten, daß Wiechowski zum Schlusse gelangt, „daß das Allantoin das Endprodukt des Harnsäurestoffwechsels der Säugetiere darstellt und daß die geringen Mengen gleichzeitig ausgeschiedener Harnsäure als (durch vorzeitige Ausscheidung der Oxydation entgangene) Zwischenprodukte anzusehen sind".

Schittenhelm[2]) hat kürzlich die Allantoinbestimmungsmethode Wiechowskis dazu verwendet, um in einer Reihe von sorgfältig durchgeführten Stoffwechselversuchen genauere Aufschlüsse über die Umsetzung verfütterter Nucleinsäure beim Hunde unter normalen und pathologischen Bedingungen zu gewinnen.

Die Versuche ergaben das interessante Resultat, daß sowohl in normalem Zustande als im Hunger die in Form ihres Natriumsalzes verfütterte Thymus-Nucleinsäure im Stoffwechsel derart gespalten wird, daß der gesamte Purinbasenanteil derselben im Harne quantitativ zum Vorschein kommt, und zwar derart, daß weitaus die Hauptmenge (93 bis 97%) davon als Allantoin auftritt, während die restlichen wenigen Prozente sich auf Purinbasen und Harnsäure verteilen. Auch in Alkoholversuchen, die der genannte Autor mit Rücksicht auf die bekannten Beziehungen des Alkoholismus zur Gicht angestellt hatte, war dieses Verhältnis nicht geändert. Ein ähnliches Verhältnis ergibt sich hinsichtlich der Relation von Allantoin, Harnsäure und Purinbasen auch

---

[1]) W. Wiechowski, Die Bedeutung des Allantoins im Harnsäurestoffwechsel. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 109, 1908. — Vgl. auch ibid. 9, 295, 1907.

[2]) A. Schittenhelm, Über die Umsetzung verfütterter Nucleinsäure beim Hunde unter normalen und pathologischen Bedingungen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 80, 1909.

aus Beobachtungen, die kürzlich Abderhalden und Einbeck[1]) ausgeführt haben, um den Abbau des Histidins im Organismus des Hundes zu studieren.

Die dominierende Stellung, die sonach dem Allantoin beim Nucleinstoffwechsel des Hundes zukommt und die auch in älteren, die Umwandlung von Harnsäure und Nucleinsubstanzen in Allantoin betreffenden Beobachtungen von Salkowski, Minkowski, Th. Cohn, Mendel und White und Wiechowski zutage tritt[2]), steht in einem auffallenden Gegensatz zu der geringen Aufmerksamkeit, die früher diesem wichtigen Stoffwechselprodukte geschenkt worden ist. In zahlreichen älteren quantitativen Untersuchungen, die den Nucleinstoffwechsel des Hundes im normalen und pathologischen Zustande zum Gegenstand hatten, ist nur vom Verhalten der Harnsäure und der Nucleinbasen, nicht aber von dem Allantoin die Rede. Es ist also nicht zu verwundern, daß die so gewonnenen Aufschlüsse recht lückenhafter Natur sind und eine ganze Reihe wichtiger einschlägiger Fragen noch ihrer Erledigung harrt.

Von diesem Gesichtspunkte aus bin ich, einer Anregung des Herrn Prof. v. Fürth folgend, an die Frage herangetreten, welchen Einfluß eine langdauernde Überschwemmung des Organismus eines Hundes mit Nucleinsäure-Spaltungsprodukten auf den Purinstoffwechsel ausübt und ob insbesondere das Verhältnis, in dem Purinbasen, Harnsäure und Allantoin dabei im Harne auftreten, der Norm gegenüber irgend eine auffallende Verschiebung zugunsten einer dieser Bestandteile erfährt.

Unsere Befunde erscheinen dementsprechend als eine Ergänzung derjenigen Schittenhelms, dessen Versuche am Hunde nur kurzdauernde (1 bis 3tägige) Fütterungsperioden mit Nucleinsäure umfassen.

Es liegt ja wohl auf der Hand, daß die Frage, ob eine langdauernde Nucleinsäure-Überschwemmung das Vermögen des Organismus, die Nucleinsäure im Sinne des Schemas

Nucleinsäure → Purinbasen → Harnsäure → Allantoin

abzubauen, schädigt, für die Auffassung des Gicht-Problemes eine besondere Wichtigkeit besitzt.

[1]) E. Abderhalden und H. Einbeck, Studien über den Abbau des Histidins im Organismus des Hundes. Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 322, 1909.

[2]) Vgl. die Literaturangaben in Abderhaldens Lehrb. d. physiol. Chemie, 2. Aufl., S. 397 bis 398.

II. Versuchsmethodik.

Ich habe meine Beobachtungen im wesentlichen an einem Hunde von weniger als 5 kg Gewicht ausgeführt, der, nachdem er annähernd ins Stickstoffgleichgewicht gebracht worden war, fast 4 Monate lang bei einer durchaus gleichmäßigen künstlichen Ernährung ununterbrochen unter Beobachtung gehalten wurde. Diese Beobachtungsreihe wurde durch einen kurzdauernden Versuch an einem zweiten Hunde, der in genau der gleichen Weise ernährt wurde, ergänzt.

Die während der ganzen Versuchsperiode gereichte tägliche Kost war (ähnlich wie in den Versuchen Schittenhelms) zusammengesetzt aus 13 g Fleischpulver, 30 g Zucker, 30 g Stärke, 30 g Schmalz und 1 g Kochsalz. Das Gemenge dieser Ingredienzen wurde mit $^1/_2$ l Wasser verkocht, sodann nach weiterem Zusatz von 200 ccm Wasser gut verrührt. Das dickbreiige Gemenge wurde von den Hunden gerne genommen und waren dieselben gewohnt, die Nahrung aus der Schüssel sehr vollständig auszulecken.

Das Fleischpulver wurde in der Weise bereitet, daß frisches, von Sehnen und Fascien möglichst befreites Pferdefleisch mit der Hackmaschine fein zerkleinert, am Wasserbade in großen Schalen vollständig getrocknet, sodann im Mörser zu Pulver gestoßen wurde.

3 analysierte Proben des Pulvers zu einem Gramm ergaben einen Stickstoffgehalt von 0,1298 g, 0,1286 g, 0,1280 g, im Mittel 0,1288 g. Das Fleischpulver enthielt sonach 12,88% N und wurde der Stickstoffgehalt der täglichen Nahrung dementsprechend mit 1,674 g in Rechnung gebracht.

Diese Nahrung hat sich als durchaus genügend und zweckmäßig erwiesen und hat unser Hund während der ganzen Dauer des Hauptversuches im Verlaufe von fast 4 Monaten (20. Oktober bis 15. Februar) sein Körpergewicht ohne wesentliche Änderungen bewahrt.

Als Nucleinsäurezugabe diente ein Präparat von nucleinsaurem Natron von der Firma Böhringer. Dasselbe gelangte während des größten Teiles des Versuches (11. November bis 5. Dezember, 13. Dezember bis 15. Februar) in täglichen Gaben zu je 5 g zur Verwendung, und zwar wurde es in Form einer Lösung der breiförmigen Nahrung beigemischt.

Dasselbe wurde, wie die Untersuchung des Kotes ergab, praktisch vollständig resorbiert und in der angegebenen Dosis, ohne Verdauungsstörungen zu erzeugen, sehr gut vertragen. In der Zeit vom 6. bis 9. Dezember wurde die Dosis auf 10 g täglich, und, da auch diese vertragen wurde, in der Zeit vom 10. bis 12. Dezember auf 15 g täglich erhöht. Nunmehr traten aber Durchfälle, verbunden mit Erbrechen auf, die mich veranlaßten, zur Dosis von 5 g täglich zurückzukehren und dieselbe bis zum Ende des Versuches beizubehalten.

Die bekannten Beziehungen des Bleies zur Gicht haben mich veranlaßt, gegen das Ende des Versuches der Nucleinsäurefütterung noch eine chronische Bleivergiftung zu superponieren. Der Hund erhielt zu diesem Zwecke vom 27. bis 29. Januar täglich 0,05 g, vom 30. Januar bis 2. Februar täglich 0,1 g Plumbum aceticum (Kahlbaum) subcutan, sodann vom 3. bis 12. Februar täglich 0,3 g, vom 13. bis 15. Februar täglich 0,1 g Plumbum aceticum per os. Vom Beginne der Bleibehandlung angefangen erschien der bis dahin stets sehr lebhafte Hund etwas niedergeschlagen, fraß jedoch anfangs sein Futter noch vollständig; doch bald verschlechterte sich der Appetit derart, daß ein Teil des Futters verschmäht wurde, während gleichzeitig die Zeichen einer beginnenden Lähmung der rückwärtigen Extremitäten bemerkbar wurden, und so mußte schließlich der Versuch abgebrochen werden.

Der Hund befand sich während der ganzen Dauer des Versuches in einem geräumigen Stoffwechselkäfig (von etwa 1 cbm Inhalt), der ein verlustloses Aufsammeln des Harnes gestattete. Der (mit Ausnahme der obenerwähnten kurzdauernden Störung) stets feste Kot wurde im Bereiche längerer Versuchsperioden vereinigt, getrocknet, gepulvert, gleichmäßig gemischt und in entnommenen Proben analysiert. In der Regel wurde der Harn mehrtägiger Perioden vereinigt und bis zu der (baldmöglichst erfolgenden) Analyse unter Toluolzusatz aufbewahrt.

Die Bestimmung der Harnsäure und der Purinbasen erfolgte nach dem Verfahren von Krüger und Schmidt[1]) in je 400 ccm des Harnes, die Bestimmung des Purinbasenstickstoffes in den Faeces nach Krüger und Schittenhelm[2]); der Gesamtstickstoff wurde nach Kjeldahl ermittelt.

Die Bestimmung des Allantoins geschah in je 50 ccm Harn nach dem Verfahren Wiechowskis[3]), wobei auf ent-

[1]) Hoppe-Seyler-Tierfelder, Handb. d. chem. Analyse, 8. Aufl., 1909, S. 590.
[2]) Ibid. S. 743.
[3]) l. c.

III. Ver-

Tabelle

Datum	Nahrung	Zulage	Körpergewicht g
Hund A. (Versuch 1)			
22. Oktober 1909	Gemischte Kost = 1,6744 g N		4700
25. „ „	„		4700
29. „ „	„		4700
2. November 1909	„		4700
6. „ „	„		4800
10. „ „	„		4850
11. „ „	„	Nat. nucl. 5 g (per os)	4850
15. „ „	„	„	4950
19. „ „	„	„	4950
23. „ „	„	„	4900
27.—29. November 1909 täglich . . .	„	„	4900
30. Nov. bis 1. Dez. „ „ . . .	„	„	4850
2.—5. Dezember „ „ . . .	„	„	4850
6.—9. „ „ „ . . .	„	Nat. nucl. 10 g (per os)	4850
10.—12. „ „ „ . . .	„	Nat. nucl. 15 g (per os)	4700
16.—20. „ „ „ . . .	„	Nat. nucl. 5 g (per os)	4700
21.—23. „ „ „ . . .	„	„	4700
28.—31. „ „ „ . . .	„	„	4700
4.—10. Januar 1910 „ . . .	„	„	4750
11.—17. „ „ „ . . .	„	„	4800
18.—24. „ „ „ . . .	„	„	4800
25.—27. „ „ „ . . .	„	„	4850
28. Jan. bis 3. Febr. 1910 täglich . . .	„	Nat. nucl. 5 g (per os) Pl. acet. 0,05—0,1 g (subcutan)	4900
4.—10. Februar „ „ . . .	„	Nat. nucl. 5 g (per os) Pl. acet. 0,3 g (per os)	4900
11. Februar „ „ . . .	„	„	4900
12. „ „ „ . . .			
13. „ „ „ . . .	„	Nat. nucl. 5 g (per os) Pl. acet. 0,1 g (per os)	4800
14. „ „ „ . . .			
15. „ „ „ . . .	„	„	4650
Hund B (Versuch 2)			
20.—24. Januar 1910 täglich	„		4800
25.—27. „ „ „			4800
28.—31. „ „ „		Nat. nucl. 5 g (per os)	4750
1.—3. Februar „ „		„	4750

sprechende Verdünnung des Harnes vor der Phosphorwolframsäurefällung, auf Vermeidung eines Bleiüberschusses bei der Bleiessigfällung und auf genaue Neutralisation vor der Quecksilberacetatfällung besonders geachtet wurde.

suche.

I.

Harn				Kot	Bemerkungen
Gesamt-N g	Harnsäure-N g	Purinbasen-N g	Allantoin-N g		
1,5400	0,0020	0,0011	0,1453		
1,7338	Spur	0,0021	0,1523		
1,4507	„	0,0022	0,1430		
1,2273	„	0,0027	0,1660		
1,8184	„	0,0030	0,1651		
2,0672	„	0,0025	0,1689		
2,2152	„	0,0023	0,4101		
2,5548	0,0010	0,0026	0,4034		
2,0383	0,0034	0,0021	0,4103		
2,2074	0,0042	0,0027	0,4183	Gesamtmenge trocken 73,5 g = 2,827 g pro Tag enthaltend 0,1733 g Gesamt-N und 0,0098 g Purin-N	Nahrung wird vollständig gefressen und gut vertragen. Hund lebhaft.
1,7280	0,0073	0,0039	0,4105		
1,7200	0,0093	0,0029	0,4044		
1,7010	0,0121	0,0030	0,3897		
1,1069	0,0247	0,0059	—		
—	—	—	—	11.—27. Jan., Gesamtmenge 39,2 g = 2,800 g pro Tag = 0,1862 g Gesamt-N und 0,0104 g Purin-N	Erbrechen und Diarrhöen. Versuch vom 10.—15. Dez. unterbrochen.
1,9261	0,0249	0,0053	0,3439		
2,0401	0,0320	0,0045	0,3527		
1,8192	0,0309	0,0041	0,3613		Nahrungsaufnahme u. Verhalten wieder normal.
2,0111	0,0342	0,0039	0,3608		
1,9991	0,0381	0,0021	0,3513		
1,7834	0,0402	0,0023	0,3425		
1,8360	0,0458	0,0009	0,3417		
2,0243	0,0501	0,0023	0,3344		
2,3674	0,0543	0,0039	0,3321	Gesamtmenge 27,58 g = 1,968 g pro Tag = 0,1395 g N = 0,0075 g Purin-N	
1,9499	0,0132	0,0025	0,2229		Hund minder lebhaft. Nahrungsaufnahme jedoch noch normal. Appetit stark vermindert. Träge Bewegungen und beginnende Lähmung der hinteren Extremitäten.
1,7733	0,0024	0,0009	0,1446		
1,4693	0,0024	0,0002	0,1253		
1,8342	0,0055	0,0003	0,4108	Gesamtmenge 22,02 g = 3,1457 g pro Tag = 0,1765 g Gesamt-N = 0,0107 g Purin-N	
1,7066	0,0103	0,0002	0,4032		

Größte Sorgfalt wurde auf genaue Ermittlung des Purinbasengehaltes des verfütterten Nucleinsäurepräparates verwendet. Dieselbe erfolgt nach dem Verfahren von Krüger und Schmidt, wobei das nucleinsaure Natron durch 4stündiges

Übersichtstabelle der täglichen Durchschnittswerte.[1])

Versuchsperiode	Nahrung		Urin					Von der Summe Purin-N + Allantoin-N entfallen auf			Kot	
	Gesamt-N	Purin-N d. Nucleinsäure	Gesamt-N	Purinbasen-N	Harnsäure-N	Allantoin-N	Summe Purin- + Allantoin-N	Purinbasen %	Harnsäure %	Allantoin %	Gesamt-N	Purin-N
Versuch 1.												
a) Vorperiode (22. Okt. bis 10. Nov.)	1,6744	—	1,6396	0,0023	Spuren	0,1567	0,1590	1,5	Spuren	98,5	?	?
b) Tägliche Zulage von 5 g Nucleinsäure-Na (11. Nov. bis 5. Dez.) .	2,0829	0,4085	2,0207	0,0028	0,0049	0,4065	0,4142	0,7	1,2	98,1	0,1733	0,0098
c) Tägliche Zulage von 5 g Nucleinsäure-Na (16. Dez. bis 27. Jan.) .	2,0829	0,4085	1,9164	0,0033	0,0351	0,3506	0,3890	0,8	9,0	90,2	0,1395	0,0075
d) Ebenso. Erstes Stadium der Bleivergiftung (28. Jan. bis 10. Febr.)	2,0829	0,4085	2,1958	0,0031	0,0522	0,3322	0,3875	0,8	13,4	85,8	0,1395	0,0075
e) Ebenso. Zweites Stadium der Bleivergiftung (11. bis 15. Febr.) . .	2,0829	0,4085	1,9499	0,0025	0,0132	0,2229	0,2386	1,0	5,5	93,5	0,1395	0,0075
Versuch 2.												
a) Vorperiode (20. bis 27. Jan.) . . .	1,6744	—	1,6213	0,0006	0,0024	0,1350	0,1380	0,4	1,7	97,9		
b) Tägliche Zulage von 5 g Nucleinsäure-Na (28. bis 31. Jan.) . . .	2,0829	0,4085	1,8392	0,0003	0,0055	0,4108	0,4166	0,1	1,3	98,6	0,1765	0,0107
c) Tägliche Zulage von 5 g Nucleinsäure-Na (1. bis 3. Febr.) . . .	2,0829	0,4085	1,7066	0,0002	0,0103	0,4032	0,4138	0,1	2,5	97,4	0,1765	0,0107

[1]) Die in vorstehender Tabelle enthaltenen Durchschnittswerte sind einfach als Durchschnitt der in der ersten Tabelle enthaltenen Zahlen des betreffenden Spatiums berechnet worden. Eine streng mathematische Behandlung hätte eine rechnerische Berücksichtigung der jeden einzelnen Zahlen entsprechenden Zahl von Tagen verlangt. Doch hätte sich eine solche Rechnung natürlich sehr verwickelt gestaltet und glaubte ich im Interesse der Einfachheit auf diese Komplikation, die eine Änderung unserer Deduktionen in keiner Weise herbeigeführt hätte, verzichten zu dürfen.

Kochen mit 4%iger Schwefelsäure unter Rückflußkühlung gespalten, die Zersetzungsflüssigkeit mit Natriumbisulfitlösung und Kupfersulfat ausgefällt, der Niederschlag mit Natriumsulfid zerlegt wurde. Schließlich wurden die Purinbasen entweder als Kupfer- oder als Silberverbindungen gefällt und der Stickstoffgehalt des Niederschlages nach Kjeldahl bestimmt. Es ergab sich:

Gesamt-N nach Kjeldahl in %	Purinbasen-N durch Fällung mit Cu in %	Ag in %
13,87	8,13	8,06
13,95	8,10	8,20
Mittel 13,91	Mittel 8,17	

Zum Vergleiche führe ich die Werte an, die andere Autoren bei Analysen desselben Präparates (nucleinsaures Natron von Böhringer) ermittelt haben:

	Gesamt-N %	Purinbasen-N %
Schittenhelm u. Bendix[1])	14,05	8,55
Schittenhelm[2])	13,35	7,22
Pollak[3])		5,00 5,50
Landau[4])	13,81	9,28 9,58

Wenn das Molekül der Nucleinsäure, der Annahme Steudels[5]) entsprechend, 15 Atome Stickstoff enthält und von diesen je 5 Atome auf 1 Molekül darin enthaltenen Guanins und Adenins, 3 Atome auf 1 Molekül Cytosin und 2 Atome auf 1 Molokül Thymin entfallen, müßte der Purinbasengehalt des Präparates, die Reinheit des Präparates vorausgesetzt, genau $^2/_3$ des Gesamtstickstoffgehaltes ausmachen, in diesem Falle also 9,28%, was etwa den Werten Landaus entsprechen würde.

---

[1]) Schittenhelm und Bendix, Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Nucleinsäuren auf den tierischen Organismus. Zeitschr. f. experim. Phathol. u. Ther. 2, 166, 1906.

[2]) Schittenhelm, Stoffwechsel der Gicht. Ibid. 4, 480, 1907.

[3]) Pollak, Über Harnsäureausscheidung bei Gicht und Alkoholismus. Arch. f. klin. Med. 88, 224, 1907.

[4]) Landau, Beiträge zur Lehre vom Purinstoffwechsel usw. Ibid. 95, 280, 1909.

[5]) H. Steudel, Die Zusammensetzung der Nucleinsäuren aus Thymus und Heringsmilch. Zeitschr. f. physiol. Chem. 49, 408, 1906.

Der letztgenannte Autor bemerkt diesbezüglich: „Wie ersichtlich, ist die Zusammensetzung des erwähnten Präparates sehr verschieden, doch ist zu bemerken, daß das von mir gebrauchte nucleinsaure Natron entschieden reiner war als dasjenige von anderen Autoren; indem nämlich Pollack und Schittenhelm auf den Gehalt von Eiweiß und Albumosen in dem Böhringerschen Präparat aufmerksam machen, gab unser Präparat weder in rohem Zustande noch im hydrolysierten eine Spur von Biuretreaktion .... Ich hatte also mit einem eiweißfreien Präparate zu tun, und dadurch wird der größere Gehalt desselben an Purin-N verständlich."

Auch in unserem Falle wird man annehmen müssen, daß von dem Stickstoffe etwa $^1/_{10}$ einer fremden Beimengung angehörte.

Wir teilen nunmehr unsere Versuche in tabellarischer Form mit (siehe Tab. I S. 446 u. 447).

IV. Diskussion der Versuchsergebnisse.

A. Vermag der Hund den Purinbasenanteil verfütterter Nucleinsäure quantitativ in Form von Purinkörpern und Allantoin auszuscheiden?

Beginnen wir zunächst mit der Betrachtung der von unseren Hunden unter normalen Verhältnissen bei einer nicht allzu reichlichen, jedoch zur Erhaltung des Körpergewichtes ausreichenden Ernährung ausgeschiedenen Mengen Purinbasen, Harnsäure und Allantoin, so ersehen wir aus der untenstehenden Zusammenstellung, daß sich unsere Werte durchaus in der Größenordnung derjenigen Zahlen bewegen, die von anderen Autoren unter ähnlichen Verhältnissen ermittelt worden sind:

	Hund von g	Gesamt-N g	Purin-basen-N g	Harn-säure-N g	Allan-toin-N g
Wiechowski[1])	3450	1,37	—	—	0,07
	3450	1,38	—	—	0,06
	2860	1,36	—	—	0,06
	2860	1,31	—	—	0,06
Schittenhelm[2])	3540	1,07	0,0017	0,0021	0,114
	5225	1,92	0,002	0,004	0,154
	5238	1,70	0,0022	0,0029	0,148
Abderhalden[3]) u. Einbeck	6795	1,9283	—	—	0,095
Hirokawa	4700	1,6396	0,0023	Spuren	0,1567
	4800	1,6744	0,0006	0,0024	0,1380

[1]) l. c. S. 115.

[2]) l. c. Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 88, 91.

[3]) l. c.

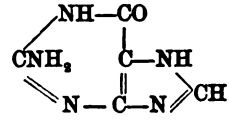
Wir gehen nunmehr zur Betrachtung der Bilanz unserer Nucleinsäurefütterungsversuche über.

Wir konstatierten zunächst, daß der in der verfütterten Nahrung und in der Nucleinsäure enthaltene Gesamtstickstoff in den Exkreten annähernd zutage tritt:

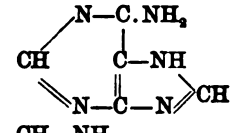
			Gesamt-N in der					
Versuch I.	Periode	b:	Nahrung	2,0829,	im	Urin	und	Kot 2,1940
„	„	c:	„	2,0829,	„	„	„	„ 2,0559
„	„	d:	„	2,0829,	„	„	„	„ 2,3353
„	„	e:	„	2,0829,	„	„	„	„ 2,0829
„ II.	„	b:	„	2,0829,	„	„	„	„ 2,0157

Es fragt sich nun, wo sich der in der verfütterten Nucleinsäure enthaltene Purinbasenstickstoff wiederfindet.

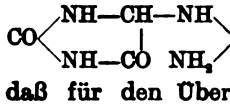
Vergleichen wir die Formeln der beiden hier in Betracht kommenden Purinbasen Guanin



und Adenin



mit der Formel des Allantoins



so lehrt die unmittelbare Betrachtung, daß für den Übergang in Allantoin nur die 4 N-Atome des Purinkernes in Betracht kommen, nicht aber das fünfte N-Atom, das in Form eines Ammoniakrestes dem Kerne anhängt und bei der Umformung der Purinbasen zu Harnsäure abgespalten werden muß. Wenn wir uns demnach die Frage vorlegen, ob die gesamten in der verfütterten Nucleinsäure enthaltenen Purinbasen als Allantoin zum Vorscheine kommen, so dürfen wir nicht den gesamten Purinbasen-N in Rechnung ziehen, sondern nur $^4/_5$ desselben.[1])

Wenn dennoch in unseren Versuchen 5 g nucleinsaures Natron mit einem Gehalte an Purinbasenstickstoff von 8,17% täglich verfüttert worden sind, so ist nicht der gesamte Purinbasenstickstoff mit $5 \times 0{,}0817 = 0{,}4085$ g N in Rechnung zu stellen, sondern nur $^4/_5$ desselben, also $\frac{0{,}4085}{5} \times 4 = 0{,}3268$ g N.

Berechnen wir nun die Summe Purin-N + Allantoin-N für den Urin in der Vorperiode a) vor Beginn der Nucleinsäurefütterung als

[1]) Wir sind Herrn Prof. Wiechowski für den Hinweis auf diesen Zusammenhang zu besonderem Danke verpflichtet.

Ausdruck des endogenen Nucleinzerfalles, so finden wir im ersten Versuche die Zahl 0,1590 g N. Nach Nucleinsäurefütterung ist der analoge Wert in Periode b) auf 0,4142 g gestiegen, die Differenz beträgt demnach 0,4142 — 0,1590 = 0,2552 g N.

Von dem mit der Nucleinsäure verfütterten Purinbasen-N (0,4085 g) ist weitaus die Hauptmenge tatsächlich resorbiert worden. Nur eine sehr geringe Menge von Purinbasen (0,0098 N) hat sich im Kote wiedergefunden. Die resorbierte Menge würde demnach (unter Vernachlässigung der sehr geringen im normalen Kote enthaltenen Menge) mit 0,4085 — 0,0098 = 0,3987 g N in Rechnung gebracht, und davon kommt $^4/_5$, d. i. 0,3189 g N für die Allantoinbildung in Betracht. Davon hat sich im Harn in Form von Allantoin, Harnsäure und Purinbasen 0,2552 g N wiedergefunden, demnach 80,0%.

Führt man eine analoge Rechnung auf für die anderen Versuchsperioden durch, so ergibt sich folgendes Bild:

Versuch 1.

	Für die Allantoinbildung in Betracht kommende Purin-N-Menge der verfütterten Nucleinsäure	Im Urin zum Vorschein gelangendes Plus an Purin-N + Allantoin-N
b) Nucleinsäurefütterung, 1. Periode	0,3189 g	0,2552 g = 80,0%
c) Nucleinsäurefütterung, 2. Periode	0,3189 g	0,2300 g = 72,1%
d) Nucleinsäurefütterung, 1. Stadium der Pb-Vergift.	0,3189 g	0,2285 g = 71,6%
e) Nucleinsäurefütterung, 2. Stadium der Pb-Vergift.	0,3189 g	0,0796 g = 24,9%
Versuch 2.		
b) Nucleinsäurefütterung, 1. Periode	0,3182 g	0,2786 g = 87,6%
c) Nucleinsäurefütterung, 2. Periode	0,3182 g	0,2758 g = 86,7%

Schittenhelm[1]) hat in seinen Versuchen 102, 99, 88%, 98% des verfütterten Basenstickstoffes als in Form von Allantoin, Harnsäure und Basen wiedergefunden berechnet und sieht die Umsetzung als eine quantitative an.

Berechnet man, um einen unmittelbaren Vergleich der Schittenhelmschen Werte mit den unsrigen zu ermöglichen, wie groß die im Harne auf die Verfütterung von je

[1]) l. c. S. 87, 89 und 92.

einem Gramm nucleinsaures Natron entfallende Mehrausscheidung von Purin-N + Allantoin-N sei, so ergibt sich (durch einfache Division der effektiven Mehrausscheidung durch die Zahl verfütterter Gramme nucleinsauren Natrons):

Hirokawa	Versuche	1 b	0,0510 g	N
„	„	1 b	0,0460 g	N
„	„	2 b	0,0557 g	N
„	„	2 c	0,0551 g	N
		Mittel	0,0519 g	N
Schittenhelm	Tabelle II, S. 80,	1—8.	XII.	0,0519
„	„ II, S. 80,	10—15.	XII.	0,0488
„	„ III, S. 80,	19—21.	XII.	0,0416
			Mittel	0,0474

Die Durchschnittswerte Schittenhelms[1]) und die meinigen stehen sich also tatsächlich sehr nahe und besteht zwischen den experimentellen Befunden sonach keinerlei Gegensatz.

Hingegen möchte ich auf einen Punkt hinweisen, der mir einer weiteren Aufklärung noch bedürftig scheint.

Die Berechnungen Schittenhelms basieren nämlich auf der Annahme (S. 83), daß dem von ihm verfütterten Präparat von thymonucleinsaurem Natron bei einem Stickstoffgehalte von 12,6% nur ein Gehalt an Basenstickstoff von 5,1% eigentümlich war. Dieser Purinbasenwert erscheint nun, zusammengehalten mit anderen für den Purinbasengehalt des nucleinsauren Natrons ermittelten Werten (s. o. Seite 449) ganz auffallend klein und dies um so mehr, als, wie oben erwähnt, Schittenhelm selbst bei der Analyse von Böhringerschen Präparaten von nucleinsaurem Natron mit einem Stickstoffgehalte von 14,05 bzw. 13,35% Purinbasenwerte von 8,55 bzw. 7,22% ermittelt hatte und es wenig wahrscheinlich scheint, daß ein so bewährter Untersucher, wie Schittenhelm, bei Darstellung eines Präparates nach dem Verfahren von Kossel und Neumann ein weniger reines Präparat gewonnen haben sollte, als es das käufliche Böhringersche Fabrikpräparat ist.[2])

[1]) Aus einer neuen Untersuchung von Schittenhelm und Seisser (Über die Beeinflussung des Stoffwechsels von Kaninchen und Hund durch Zufuhr von Nucleinsäure, Harnsäure, Allantoin usw., Zeitschr. f. experim. Pathol. 7, 117, Okt. 1909) ersehen wir (Vers. 3), daß ein Hund nach intravenöser Zufuhr von 2,5 g thymonucleinsauren Natrons eine Mehrausscheidung von 0,215 — 0,110 = 0,105 g Allantoin-N am 1. Tage, von 0,133 — 0,110 = 0,023 am 2. Tage und 0,149 — 0,110 = 0,039 g am 3. Tage aufwies; im ganzen also eine Mehrausscheidung von 0,105 + 0,023 + 0,039 = 0,167 g N, d. i. einem Gramm nucleinsauren Natrons entsprechend eine Mehrausscheidung von 0,067 g Allantoin-N.

[2]) Vgl. diesbezüglich auch die neuen Versuche von Schittenhelm und Seisser (Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 7, 131, Okt. 1909), wo in Versuch 3 aus 0,5 g thymonucleinsauren Natrons 0,038 g Basen-N wiedergefunden wurde, i. c. 7,6%.

Berücksichtigt man nun aber andererseits den vorerwähnten Umstand, daß nur $^4/_5$ des Basen-N effektiv für die Allantoinbildung in Betracht kommen können, so ergibt sich, daß Schittenhelm eigentlich um $^1/_5$ mehr Purin-N + Allantoin-N so im Harne wiedergefunden hat, als dem angegebenen Purinbasengehalte seines Präparates entspricht.

Die Frage, ob der Hund die Nucleinsäure derart verarbeiten könne, daß tatsächlich die gesamten darin enthaltenen Purinbasen restlos als Allantoin und als Purinkörper im Harne zum Vorscheine kommen, scheint mir daher noch nicht abgeschlossen zu sein.

Meine Versuche scheinen mir jedoch darauf hinzudeuten, daß eine solche quantitative Verarbeitung der Purinbasen doch wohl nicht immer erfolgen dürfte. Wir hatten im Beginne unserer Versuche diesbezüglich ein (wohl außerhalb der Fehlergrenzen liegendes) Defizit von 20% bzw. 13% zu verzeichnen, und wir sahen dasselbe im weiteren Verlaufe unseres Dauerversuches auf 28% ansteigen.

Auf das rapide Absinken der Allantoinwerte, das wir im späteren Stadium der Bleivergiftung (Versuch 1e) verzeichnet haben, möchten wir wegen der gleichzeitig bestehenden schweren Allgemeinerkrankung keinen allzu großen Wert legen. Es sei jedoch bei dieser Gelegenheit darauf hingewiesen, daß auch Abderhalden und Einbeck[1]) gelegentlich (nach Histidinzusatz) ein jähes Absinken der normalen Allantoinwerte bemerkt haben.

Wir möchten daher, ohne die Möglichkeit eines quantitativen Ablaufes des in Rede stehenden Stoffwechselvorganges leugnen zu wollen, doch der Meinung Ausdruck geben, daß weitere Untersuchungen in dieser Richtung erwünscht wären. Vielleicht stellt es sich dann doch heraus, daß obige Differenzen in irgend welchen Mängeln der Versuchsmethodik begründet waren.

Nach den neuesten Untersuchungen Wiechowskis (diese Zeitschr. 25, 453, 1910) muß übrigens auch mit der Möglichkeit einer Allantoinzersetzung im alkalischen Darminhalte gerechnet werden.

B. Veränderte Relation der Purinderivate im Harne nach langdauernder Nucleinsäurefütterung.

Als der interessanteste Befund unserer Beobachtungsreihe erscheint eine auffallende Vermehrung der Harnsäureausscheidung nach langdauernder Nucleinsäurefütterung.

[1]) l. c. S. 327.

Die Harnsäureausscheidung war in der Vorperiode unseres Hauptversuches auffallend klein. Unser Versuchshund schied im Verlaufe der ersten Wochen so geringe Harnsäuremengen aus, daß eine quantitative Bestimmung praktisch unmöglich war.

Erst nach Beginn der Nucleinsäurefütterung am 11. November wurde die Harnsäureausscheidung quantitativ bestimmbar, doch blieb dieselbe im Laufe der ersten Woche recht gering (0,0010 bis 0,0037). Sie stieg aber, von da angefangen, allmählich und kontinuierlich an. Der Stickstoff der Harnsäure betrug am 1. Dezember bereits 0,0093, eine Woche später 0,0247. Ende Dezember 0,0309, Ende Januar 0,0458. Im ersten Stadium der nunmehr beginnenden chronischen Bleivergiftung erfolgte noch ein weiterer Anstieg, und am 10. Februar war mit einer Ausscheidung von 0,0543 g Harnsäure-N der Höhepunkt erreicht.

Gleichzeitig war die Allantoinausscheidung etwas zurückgegangen. Während im Beginne des Versuches von der Summe Purin-N + Allantoin-N $98^1/_2\,\%$ auf das Allantoin und nur $1^1/_2\,\%$ auf die Purinbasen und die Harnsäure zusammen entfallen waren, kamen nunmehr auf das Allantoin nur mehr $85{,}8\,\%$, auf die Harnsäure dagegen $13{,}4\,\%$. Die Purinbasen dagegen hatten mit dem Anstiege der Harnsäure in keiner Weise Schritt gehalten und waren auf dem ursprünglichen niedrigen Niveau geblieben.

Der Umfang der Mehrausscheidung an Harnsäure wird augenfällig, wenn man sich vergegenwärtigt, daß die maximale Ausscheidung der Harnsäure den am Ende der ersten Woche der Nucleinsäurefütterung erreichten Wert um mehr als das 15fache überstieg.

Im weiteren Verlaufe der Bleivergiftung erfolgte gleichzeitig mit dem Einsetzen schwerer Allgemeinerscheinungen und dem Abfalle der Allantoinsäureausscheidung ein jähes Absinken der Harnsäureausscheidung.

Es sei hier darauf hingewiesen, daß weder Lüthje[1]) noch Preti[2]) eine ähnliche Beeinflussung der Harnsäureausscheidung bei ihren Versuchen über chronische Bleivergiftung am Hunde wahrgenommen haben. Ersterer sah nach monatelanger Zufuhr von Plumbum aceticum keine auffallende Änderung der Tagesausscheidung an Harnsäure, und letzterer

[1]) Lüthje, Über Bleigift und den Einfluß der Bleiintoxikation auf die Harnsäureausscheidung. Zeitschr. f. klin. Med. 29, 206, 1896. — Beiträge zur Kenntnis der Allorurkörperausscheidung. Jb. 31, 112, 1897.

[2]) Preti, Wirkung von Bleihydrosol und Bleiacetat auf den Stoffwechsel. Diese Zeitschr. 21, 551, 1909.

faßte seine Beobachtungen dahin zusammen, „daß die Einführung von Bleihydrosol und Bleiacetat in nicht toxischen Mengen den Stickstoffumsatz fördert ... Die Einwirkung auf die Harnsäure ist eine minder entschiedene und gleichmäßige. Im ganzen erfährt auch die Ausscheidung dieser letzteren eine Zunahme ... Der Zunahme folgen Perioden von verminderter Ausscheidung".

Das Wesentliche bei unseren Versuchen war ja auch zweifellos nicht die Bleiintoxikation, sondern die langdauernde Nucleinsäureüberschwemmung, und auf diese ist die beobachtete Stoffwechselalteration sicherlich zurückzuführen.

Es hat sich also ergeben, daß der Stoffwechsel eines monatelang mit Nucleinsäure gefütterten Hundes eine auffällige Änderung erfahren hatte insofern, als dem Organismus das Vermögen, die Harnsäure annähernd vollständig zu Allantoin zu oxydieren, abhanden gekommen war und ein größerer Bruchteil derselben in unverändertem Zustande zur Ausscheidung gelangte. Die Umwandlung der Purinbasen in Harnsäure dagegen hatte nicht gelitten, derart, daß nach wie vor die Menge derselben, die in unverändertem Zustande zur Ausscheidung gelangte, eine minimale blieb.

Leider sah ich mich durch äußere Umstände gezwungen, diese äußerst mühsame und zeitraubende Untersuchung abzubrechen. Es war mir daher nicht möglich festzustellen, ob und inwieweit das hier beobachtete Verhalten als Regel gelten könne und ob eine langdauernde Nucleinsäurefütterung stets eine vermehrte Harnsäureausscheidung zur Folge habe. Jedenfalls ermutigen aber die bisher gemachten Erfahrungen, auf dem eingeschlagenen Wege weiterzuschreiten, und so darf ich wohl der Hoffnung Ausdruck geben, daß eine Weiterführung dieser Untersuchungen, die ich nunmehr anderen überlassen muß, dem Gichtprobleme zustatten kommen möge.

Zusammenfassung.

1. Ein mit gemischter Kost gleichmäßig ernährter kleiner Hund vertrug drei Monate lang die tägliche Verfütterung von 5 g nucleinsauren Natrons, ohne eine Einbuße an Körpergewicht, eine Verdauungsstörung oder sonstige auffällige Schädigung zu erleiden.

2. Der Purinbasenanteil der verfütterten Nucleinsäure kam dabei im Harne zum weitaus größten Teil in Form von Allan-

toin und nur zum geringen Teile in Form von Harnsäure und Purinbasen zum Vorscheine, und zwar war dies auch der Fall, nachdem der Nucleinsäurefütterung noch eine chronische Bleivergiftung superponiert worden war.

3. Die Berechnung der Stoffwechselbilanz mit Bezug auf die in der verfütterten Nucleinsäure enthaltenen Purinbasen ergab, daß in zwei Hundeversuchen von dem für die Umwandlung in Harnsäure bzw. Allantoin theoretisch in Betracht kommenden Stickstoffanteile 72 bis 88% im Harn in Form von Purinkörpern und Allantoin zum Vorscheine gekommen sind. Die Frage, unter welchen Umständen diese Umsetzung quantitativ und restlos im Sinne Schittenhelms verlaufen könne, erscheint noch offen.

4. Bei der langdauernden Nucleinsäurefütterung entsprach je einem Gramme verfütterten nucleinsauren Natrons durchschnittlich eine Mehrausscheidung von 0,0519 g Stickstoff in Form von Purinkörpern und von Allantoin. (Schittenhelms Versuche ergeben als analogen Wert 0,0474.)

5. Im Verlaufe des Fütterungsversuches war eine Veränderung der Stoffwechselvorgänge in dem Sinne wahrnehmbar, daß die tägliche Allantoinausscheidung nach einiger Zeit eine merkliche Abnahme zeigte. Gleichzeitig ging die Harnsäureausscheidung sehr beträchtlich und kontinuierlich in die Höhe, derart, daß nach 10 Wochen etwa 10 mal mehr Harnsäure täglich ausgeschieden wurde als in der ersten Woche der Nucleinsäurefütterung. Die Superponierung einer chronischen Bleivergiftung bewirkte noch einen weiteren erheblichen Anstieg der Harnsäureausscheidung. Während im Beginne der Nucleinsäurefütterung nur etwa 1% der Summe des Purin-N und des Allantoin-N auf Harnsäure-N entfiel, war diese Quote schließlich über 13% angestiegen. Ein gleichzeitiger Anstieg der Purinbasenausscheidung war nicht wahrnehmbar.

6. Die Befunde deuten darauf hin, daß der Stoffwechsel des Versuchstieres durch die langdauernde Überschwemmung mit Nucleinsäurespaltungsprodukten derart beeinflußt worden ist, daß das Vermögen des Organismus, Harnsäure annähernd vollständig zu Allantoin zu oxydieren, eine Beeinträchtigung erfahren hatte.

Über Leim und Tannin.

Von

Hans Trunkel.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 9. Mai 1910.)

Mit 16 Figuren im Text.

Der Zweck vorliegender Arbeit, die ich auf Anregung des Herrn Prof. Dr. Boehm[1]) und unter dessen Anleitung ausgeführt habe, war, die Vorgänge eingehender zu studieren, die bei der Einwirkung der Lösungen von Leim und Tannin aufeinander stattfinden und zur Entstehung des sogenannten Leimtannates führen.

Der gleiche Gegenstand ist in zahlreichen Publikationen aus älterer und neuerer Zeit behandelt oder berührt worden.

Von gelegentlichen Beobachtungen und theoretischen Betrachtungen abgesehen, ist aber die Reaktion von Tannin auf Leim nach den neueren Gesichtspunkten der Kolloidchemie, soviel mir bekannt, noch nicht genauer verfolgt worden.

Im allgemeinen zählt man sie heutzutage zu den Adsorptionsvorgängen.

Da, wie später mitgeteilt werden wird, zwischen dem Bindungsvermögen wässeriger Leimlösungen für Tannin und

---

[1]) Nachdem ich die Veränderlichkeit des Bindungsvermögens des Leims für Tannin und der optischen Aktivität des Leims mit der Zeit schon vor mehreren Jahren beobachtet hatte, veranlaßte ich den Herrn Verfasser, den Gegenstand genauer zu verfolgen und auszuarbeiten.
R. Boehm.

ihrer optischen Aktivität eine merkwürdige Analogie besteht, habe ich auch genauere Untersuchungen über die Circumpolarisation wässeriger Leimlösungen ausgeführt, über die in der folgenden Mitteilung berichtet werden soll.

Es finden sich in der Literatur nur wenige Angaben über die Natur des Leimtannates sowie über den Charakter der Reaktion von Tannin auf Leim.

Von älteren Autoren seien Mulder[1]) und Böttinger[2]) genannt, die dem Leimtannat salzartigen Charakter zuschrieben. In neuerer Zeit hat sich Ed. Stiasny[3]) auf Grund der verschiedenen Bindungsverhältnisse zwischen Leim und Tannin für einen Adsorptionsvorgang zwischen beiden Kolloiden entschieden. Eine Stütze findet diese Annahme eines Adsorptionsvorganges durch die Versuche, die bezüglich der Bindung des Tannins seitens Hautpulver angestellt worden sind.

v. Schröder[4]) untersuchte die Abhängigkeit der vom Hautpulver gebundenen Tanninmenge von der Konzentration der Tanninlösung und kam auf Grund der dabei gemachten Beobachtungen zu der Annahme, daß man es bei diesem Vorgange nicht mit einem chemischen Prozesse zu tun habe.

Die gleiche Ansicht vertritt Körner[5]), der die von v. Schröder erhaltenen Resultate benutzte, um die Theorie des Gerbprozesses mathematisch zu formulieren.

In jüngster Zeit haben Herzog und Adler[6]) die Gerbung des Hautpulvers durch andere Stoffe als das Tannin untersucht, sie gelangten ebenfalls zu der Annahme, daß es sich dabei um Adsorptionsvorgänge handele. Überhaupt betrachtet man heutzutage den Gerbprozeß im wesentlichen als Adsorptionsvorgang, und da man die Fällung des Leims durch Tannin recht wohl als einen der Gerbung analogen Vorgang bezeichnen kann, hat auch hier die Annahme einer Adsorption eine gewisse Berechtigung.

Recht zahlreich sind die Autoren, die die Fällung von Leim durch Tannin zu Wertbestimmungsmethoden für Leim oder für Tannin benutzten, indem sie die Annahme eines konstanten Bindungsverhältnisses zwischen Leim und Tannin machten. Beiträge zur Kenntnis der Natur der Reaktion zwischen Leim und Tannin finden sich in diesen Arbeiten nicht, so daß von ihrer Besprechung abgesehen werden kann.

---

[1]) Liebigs Annalen 31, 124, 1839.

[2]) Ibid, 244, 227, 1888.

[3]) Chem.-Zeitg. 32, I, 593, 1908.

[4]) v. Schröder, Gerberei-Chemie. Berlin 1898. S. 396.

[5]) Beiträge zur Kenntnis der wissenschaftlichen Grundlagen der Gerberei. Teil 3. Freiberg i. S. 1903.

[6]) Zeitschr. f. Chem. u. Industrie der Kolloide 2, 2. Supplementheft 3, 1908.

Vorbemerkungen über das verwendete Material.

1. Leim.

Als Ausgangsmaterial diente käufliche Gelatine Marke 0 und 00, aus einem hiesigen Drogengeschäft bezogen. Daraus wurden durch Reinigung 4 verschiedene Präparate (im Text mit I, II, III und V bezeichnet) hergestellt.

Leim I und II, nach der Methode von Hofmeister[1]) gewonnen, fand ich beim Beginn meiner Arbeit bereits im Institut vor. Leim V habe ich nach der gleichen Methode, Leim III nach dem von Mörner[2]) angegebenen Verfahren dargestellt. Mit Leim IV ist das in einzelnen Fällen zu vergleichenden Versuchen herangezogene, nicht gereinigte Ausgangsmaterial bezeichnet.

Durch das Verfahren von Mörner wurde zwar, wie aus der Tabelle S. 461 ersichtlich, ein Präparat erhalten, das den niedrigsten Gehalt an anorganischen Stoffen aufwies. Die Reinigung (im wesentlichen beruhend auf Auslaugen der zerkleinerten gequollenen Gelatine mit 0,1 %iger Kalilauge, hierauf mit 0,1 %iger Essigsäure und schließlicher Entwässerung der ausgelaugten Gallerte mit Alkohol) ist aber eine so zeitraubende und mit so großem Materialverlust verbundene Arbeit, daß ich die Hauptmenge des Materials nach der einfacheren Hofmeisterschen Methode (mehrtägiges Auswaschen der gequollenen Gelatine mit großen Mengen destillierten Wassers, schließlich Fällung der bei gelinder Wärme gelösten und im Wärmetrichter filtrierten Gallerte mit Alkohol) darstellte.

Abgesehen von dem etwas geringeren Aschegehalt des Mörnerschen Präparates, war das Verhalten der nach beiden Methoden gereinigten Gelatine, soweit ich es bei meinen Versuchen beobachten konnte, das gleiche. Beide Präparate wurden noch feucht in möglichst kleine Stücke zerschnitten, an der Luft getrocknet und die Vorräte in gut verschlossenen Glasbüchsen aufbewahrt.

Nachstehende Tabelle enthält die Resultate von Aschebestimmungen, die mit Leim I, III, IV und V ausgeführt

[1]) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 315, 1878/79.
[2]) Ibid. 28, 474, 1899.

wurden. (Von Leim II war nur ein kleinerer Vorrat zur Disposition, dessen ich zu anderen Zwecken bedurfte.)

Leimsorte:	Leim bei 100° konstant g	Asche g	Asche %	Asche im Mittel %
I. (Hofmeister)	1,2720 1,1615	0,0035 0,0033	0,28 0,28	0,28
III. (Mörner)	1,2660 1,4977	0,0025 0,0028	0,20 0,19	0,20
IV. (Handels-Gelatine)	1,2300 1,3261	0,0288 0,0310	2,34 2,34	2,34
V. (Hofmeister)	1,1992 1,2160	0,0026 0,0029	0,22 0,24	0,23

Man erkennt, daß durch die Reinigung der Gehalt an Elektrolyten auf ca. $^1/_{10}$ reduziert werden kann.

2. Tannin.

Als Ausgangsmaterial diente Tannin. leviss. puriss. Merck, von dem ein Teil nach der Methode von Rosenheim und Schidrowitz (Behandlung der Acetonlösung des Tannins mit Äther und schließlich mit Wasser[1]) gereinigt wurde. Dieses Präparat ist in der Arbeit als Tannin III angeführt.

Zwei andere, nach der gleichen Methode gereinigte Präparate (Tannin I und II) waren im Institut schon vorhanden, als Rohmaterial hatte Kahlbaumsches und Mercksches Tannin gedient.

Die Bestimmung der optischen Aktivität ergab

1. für Tannin Merck: $[\alpha]_D^{n^\circ} = +72{,}7^\circ$

und 2. für das daraus erhaltene Tannin III: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +72{,}5^\circ$

so daß in dieser Hinsicht die Reinigung das Verhalten des Tannins nicht beeinflußt hat.[2])

Das Mercksche Tannin wies aber einen geringen Gehalt an Gallussäure auf, von der in den daraus gewonnenen gereinigten Präparaten nichts nachzuweisen war.

[1]) Journ. of Chem. Soc. 73, 882, 1898.

[2]) Bei Anwendung ihrer Methode gelangten Rosenheim und Schidrowitz, selbst bei Verwendung sehr schlechten Rohmaterials, stets zu einem Tannin von 75 bis 75,2° Drehungswert. Ein anderer Autor (Leo F. Iljin, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 1731, 1909) erhielt bei Anwendung dieser Methode ein Tannin von nur 70,9° Drehungswert.

I. Das Bindungsvermögen des Leims für Tannin.

Es war von vornherein sehr wenig Aussicht vorhanden, durch gewichtsanalytische Methoden über die Mengenverhältnisse Aufschluß zu erhalten, in denen Tannin und Leim sich miteinander verbinden. Um aber mit einem der Maßanalyse nachgebildeten Verfahren zum Ziele zu gelangen, waren zunächst folgende Vorfragen durch den Versuch zu erledigen:

1. Stehen einfache Reaktionen zur Verfügung, durch die sehr kleine Mengen von Tannin und Leim rasch und sicher nachzuweisen sind?

2. Lassen sich Tannin und Leim nebeneinander in kleinen Mengen in einer wässerigen Lösung nachweisen?

3. Gibt es bei der Fällung einer Leimlösung mit einer Tanninlösung einen Punkt (Grenzpunkt), in dem das Filtrat vom Leimtannat völlig oder annähernd frei von Tannin und Leim ist?

ad. 1. Zum Nachweis von Tanninspuren eignet sich am besten eine wässerige Ferrichloridlösung (Liq. ferri sesquichlor. D. A. IV mit gleichen Teilen Wasser verdünnt. Man versetzt 10 ccm der auf Tannin zu prüfenden Lösung mit 2 Tropfen dieser Lösung). Versuche ergaben, daß die Reaktion noch in einer Konzentration des Tannins von 1:130000 eine deutliche Blaufärbung gibt. Etwas weniger empfindlich ist die Reaktion mit 10%iger Kalilauge auf Tannin. Hier (10 ccm Tanninlösung + 6 Tropfen dieser Kalilauge) tritt noch bei einer Tanninkonzentration von 1:100000 deutliche Rotfärbung ein.

Diese Rotfärbung ist bei künstlichem Licht viel schlechter wahrnehmbar als die durch Eisenchlorid bewirkte Bläuung und tritt (namentlich bei Tanninlösungen von geringer Konzentration) erst nach 5′ deutlich auf.

Leim kann durch die Tanninprobe (10 ccm Leimlösung + 3 Tropfen 10%iger Tanninlösung) noch in Konzentrationen von 1:50000 bis 60000 an der auftretenden Trübung erkannt werden.

Pikrinsäure (10 ccm Leimlösung + 3 Tropfen 1%iger Pikrinsäurelösung) zeigt Leim nur bis zu einer Konzentration von 1:10000 sicher an.

Das empfindlichste Reagens für Leim ist Kaliumquecksilberjodid (5 ccm Leimlösung mit 1 Tropfen verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit 2 Tropfen des konzentrierten Reagens versetzt). Die Reaktion läßt den Nachweis von Leim noch in der Konzentration von 1:125000 zu; bei sehr geringer Leimkonzentration wird die milchige Trübung erst nach dem Absetzen des ausgeschiedenen Jodquecksilbers (nach 5 bis 10′) deutlich sichtbar.

ad 2. In Lösungen, die zugleich Tannin und Leim enthalten, kann ersteres durch Ferrichlorid, letzterer durch konzentriertere Tanninlösung (Trübung) oder durch Kaliumquecksilberjodid erkannt werden.

Die angegebenen Empfindlichkeitsgrenzen haben nur dann Geltung, wenn sich außer Tannin resp. Leim keine anderen Substanzen in der Lösung befinden. Für diesen Fall erschien die Empfindlichkeit der Reaktionen aber ausreichend, um sie bei der quantitativen Untersuchung der Bindung von Tannin durch Leim zugrunde zu legen.

ad 3. Wenn man verschiedene Proben einer Leimlösung mit genau abgestuften verschiedenen Volumina einer Tanninlösung versetzt und die klare Flüssigkeit von dem abgeschiedenen Leimtannat durch ein Asbestfilter trennt, so erhält man bei einer bestimmten Tanninmenge ein Filtrat, in dem durch obige Reagenzien weder Tannin noch Leim nachweisbar sind.

Es ist also möglich, Leim aus seinen wässerigen Lösungen durch Tannin (und umgekehrt) annähernd vollständig abzuscheiden.

Der vorliegende Abschnitt dieser Abhandlung wird sich eingehender mit diesem Grenzfall beschäftigen, in dem, wie ich hier vorgreifend bemerke, das abgeschiedene Leimtannat auch bei anhaltender Behandlung mit destilliertem Wasser weder Leim noch Tannin in nachweisbaren Mengen an das Wasser abgibt, also ein scheinbar beständiges und praktisch als in Wasser unlöslich zu bezeichnendes Leimtannat entsteht.

Hat man eine Leimlösung mit zu wenig Tanninlösung versetzt, so läßt sich der Niederschlag nur sehr langsam durch Asbest von der klaren Flüssigkeit trennen, die dann aber neben Leim stets auch Tannin enthält, offenbar weil das frisch gefällte Tannat etwas in dem noch vorhandenen überschüssigen Leim löslich ist.

In Filtraten von Proben, die über den Grenzpunkt hinaus, also mit einem Überschuß von Tannin versetzt worden sind, fand ich nur Tannin, niemals aber Leim, wonach Leimtannat als in überschüssigem Tannin unlöslich bezeichnet werden kann.

Auf Grund der vorstehend mitgeteilten Erfahrungen mußte es möglich sein, wenigstens sehr annähernd genau die Verhältnisse zu ermitteln, in denen sich Leim und Tannin in dem oben definierten Grenzpunkte miteinander verbinden und ein wasserunlösliches und wasserbeständiges Leimtannat bilden.

Der bei den quantitativen Versuchen eingeschlagene Weg ist zunächst durch einige Vorbemerkungen genauer zu beschreiben.

Leimlösungen. Die trockenen Leimstücke ließ ich in der erforderlichen Wassermenge über Nacht quellen, bewirkte sodann die Auflösung durch 3stündiges Erwärmen auf 40° im Brutschrank und filtrierte die warme Lösung.

Zur Ermittlung der Konzentration wurden 10 ccm der auf Zimmertemperatur abgekühlten Lösung in einer Platinschale zur Trockne verdampft und nach dem Erhitzen auf 100° bis zur Gewichtskonstanz der Trockenrückstand bestimmt. Die Tanninlösung war in allen Versuchen 1 %ig, bezogen auf bei 100° getrocknetes gereinigtes Tannin.

Je 10 ccm der Leimlösung wurden in 6 geeignete kleine Kolben abpipettiert und die einzelnen Portionen aus einer Bürette mit nach 0,1 ccm abgestuften Volumina 1 %iger Tanninlösung versetzt, gut umgeschüttelt und 15 Minuten stehen gelassen. Hierauf wurden ungefähr gleiche Volumina von den Niederschlägen durch Asbestfilter[1]) in Probezylinder abfiltriert und auf Tannin resp. Leim geprüft.

Dabei war vorausgesetzt worden, daß beim Zusammenbringen von Leim- und Tanninlösung in kurzer Zeit Gleichgewicht eintritt.

Obwohl ich für diese Voraussetzung durch anderweite Versuche den Beweis der Richtigkeit erbracht habe, habe ich doch eine Anzahl Versuche in etwas modifizierter Weise ausgeführt, indem ich das Reaktionsgemisch vor dem Abfiltrieren 5 bis 10′ in Glasstöpselflaschen von 60 ccm gründlich durchschüttelte.

Das Resultat war das gleiche wie bei den nicht geschüttelten Versuchen.

Einige Beispiele dieser Titrierungen mögen hier folgen.

1. Titrierung einer frisch bereiteten Leimlösung (Leim I).

Je 10 ccm Leimlösung (0,41 %) wurden mit der angegebenen Menge Tanninlösung (1 %) versetzt.

---

[1]) Da v. Schröder (Dinglers Polytechnisches Journal 269, 38 und 82, 1888) und Sesti (Chem. Centralbl. 2, 745, 1901) nachgewiesen haben, daß Filtrierpapier Gerbstoff adsorbiert, wurde als Filtriermaterial ausschließlich Asbest verwendet.

Tanninlösung in ccm	Tanninreaktion im Filtrat
3,4	deutlich
3,3	„
3,2	minimal
3,1	„
3,0	0
2,9	enthält Tannin und Leim

Demnach ist die vorletzte Probe der Grenzfall, es binden also 0,041 g Leim 0,030 g Tannin.

Der Grenzfall ist im weiteren Verlauf der Arbeit durch die „Grenzzahl" wiedergegeben, die angibt, wieviel Teile Tannin von 1 Teil Leim gebunden werden.

Sie beträgt für das obige Beispiel 0,73.

2. Titrierung der gleichen, jedoch 24h alten Leimlösung.

Tanninlösung in ccm	Tanninreaktion im Filtrat
2,3	deutlich
2,2	minimal
2,1	„
2,0	„
1,9	0
1,8	enthält Tannin und Leim

Daraus berechnet sich als Grenzzahl 0,46.

Bezüglich des weiteren Verhaltens dieser Leimlösung sei auf Versuchsreihe 2 in Tabelle I, S. 466 verwiesen.

Vermittels des Titrierungsverfahrens habe ich die fünf eingangs genannten Leimsorten auf ihr Bindungsvermögen für Tannin untersucht.

Bei allen verminderte sich das Bindungsvermögen innerhalb der ersten 24h um ungefähr 50%, weiterhin erfolgte langsame Abnahme, wie aus den Tabellen und graphischen Darstellungen I—V ersichtlich ist.

Es erübrigt noch zu bemerken, daß das Bindungsvermögen derjenigen Leimlösungen, die über 72h hinaus beobachtet wurden, nur mehr wenig abnahm, und daß diese (scheinbar) unbegrenzte Abnahme wohl auf beginnende langsame Zersetzung der Lösung durch Mikroben zurückzuführen ist.

Um das Verhalten der einzelnen Leimsorten untereinander vergleichen zu können, sind von sämtlichen für die einzelnen Altersstufen gefundenen Grenzzahlen die Mittelwerte genommen worden und in Tabelle VI zusammengestellt.

Tabelle I.

Grenzzahlen für Leim I.

Versuchsreihe	Art der Ausführung	Alter der Leimlösung							Konzentration der Leimlösung %
		Frisch	24h	48h	72h	96h	120h	144h	
		Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin							
1	Nicht geschüttelt	0,78	—	0,43	0,40	0,38	0,35	0,33	0,40
	Nach 72h erwärmt	0,78	—	0,35	—	—	—	—	
2	Nicht geschüttelt	0,73	0,46	0,44	—	0,39	0,37	0,34	0,41
3	Nicht geschüttelt	0,74	0,48	0,45	—	0,41	0,38	0,36	0,42
4	Nicht geschüttelt	0,77	—	0,43	0,37	0,30	—	—	0,30
	Geschüttelt	—	—	0,37	0,30	0,27	—	—	
5	Nicht geschüttelt	0,77	—	0,37	0,33	—	0,27	—	0,30
	Geschüttelt	0,73	—	0,40	0,33	—	0,27	—	
6	Nicht geschüttelt	0,78	0,48	—	—	—	—	—	0,27
	Geschüttelt	0,78	0,48	—	—	—	—	—	

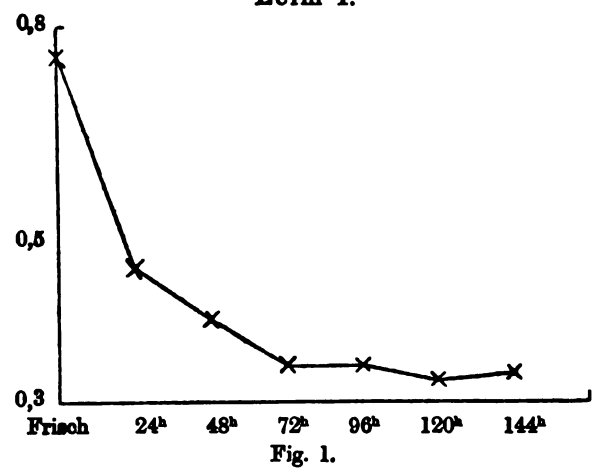


Fig. 1.

Noch besser veranschaulichen die Abnahme des Bindungsvermögens die Kurven Fig. 1 bis 5. Auf der Ordinate sind die Mittelwerte der Grenzzahlen (vgl. Tab. VI S. 470), auf der Abszisse die Altersstufen des Leims aufgetragen.

Man sieht aus der Zusammenstellung der Mittelwerte (Tab. VI, S. 470), daß das Bindungsvermögen der verschiedenen Leimsorten für Tannin Schwankungen aufweist. Es ist dies bei Beachtung des Umstandes, daß Leim ein nach chemischen Grundsätzen nicht scharf zu charakterisierender Stoff ist, nicht verwunderlich. Das höchste Bindungsvermögen zeigt Leim II, das geringste die gewöhnliche Gelatine (Leim IV).

Tabelle II.
Grenzzahlen für Leim II.

Versuchsreihe	Art der Ausführung	Alter der Leimlösung: Frisch	24h	48h	72h	96h	120h	144h	Konzentration der Leimlösung %
		Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin							
1	Nicht geschüttelt	0,79	0,57	0,55	0,50	0,48	—	0,41	0,42
	Nach 72h erwärmt	0,79	0,55	—	—	—	—	—	
2	Nicht geschüttelt	0,81	—	—	—	—	—	—	0,47
	Geschüttelt	0,83	—	—	—	—	—	—	

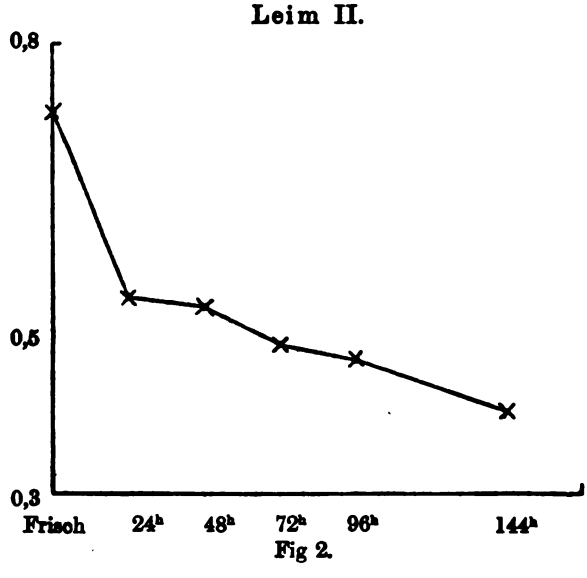


Fig 2.

Zu bemerken ist noch, daß sich das Bindungsvermögen einer beliebig gealterten Leimlösung durch Erwärmen derselben wieder auf seinen ursprünglichen maximalen Wert bringen läßt. Es finden sich dazu einige Beispiele in den Tabellen I bis V.

Da sich beim Grenzfall im Filtrat des Leimtannates Leim und Tannin nicht nachweisen ließ, so mußte ein solches Filtrat ohne Hinterlassung eines Rückstandes verdampfen und sich dadurch das Ergebnis der maßanalytischen Bestimmung kontrollieren lassen.

Diese Rückstandsbestimmungen habe ich in der Weise ausgeführt, daß ich durch Titrierung den Grenzfall ermittelte, in diesem Verhältnis etwas größere Volumina mischte und einen aliquoten Teil des Filtrates zur Trockne brachte.

Tabelle III.

Grenzzahlen für Leim III.

Versuchsreihe	Art der Ausführung	Alter der Leimlösung							Konzentration der Leimlösung %
		Frisch	24h	48h	72h	96h	120h	144h	
		Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin							
1	Nicht geschüttelt	0,66	0,34	0,32	—	0,26	0,24	—	0,38
	Geschüttelt	—	0,32	0,29	—	0,26	0,21	—	
2	Nicht geschüttelt	0,66	0,37	0,34	0,34	—	0,32	0,32	0,38
	Geschüttelt	0,63	0,37	0,34	0,32	—	0,32	0,28	
3	Nicht geschüttelt	0,70	—	0,38	0,38	0,38	0,35	—	0,40
	Geschüttelt	0,68	—	0,35	0,35	0,35	0,35	—	
4	Nicht geschüttelt	0,70	0,44	—	0,37	—	—	—	0,43
	Geschüttelt	0,70	0,42	—	0,35	—	—	—	
5	Nicht geschüttelt	0,73	0,33	—	0,30	—	—	—	0,40
	Geschüttelt	0,70	0,33	—	0,30	—	—	—	
6	Nicht geschüttelt	0,72	0,42	—	0,39	—	—	—	0,36
	Geschüttelt	0,69	0,39	—	0,36	—	—	—	

Leim III.

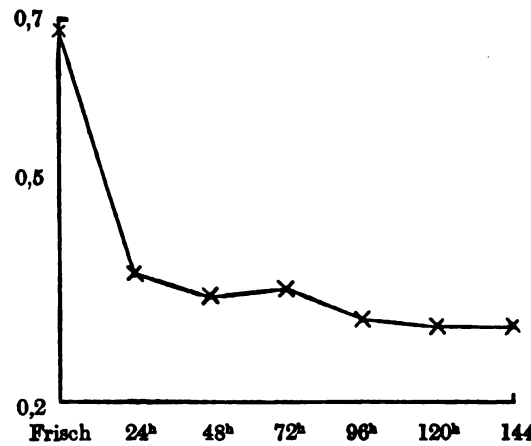


Fig. 3.

Zu den nachstehend beschriebenen Rückstandsbestimmungen diente Leim I und Tannin III.

1. Rückstandsbestimmung. Eine 0,46%ige frisch bereitete Leimlösung ergab den Grenzfall bei 10 ccm Leimlösung + 3,3 ccm 1%ige Tanninlösung, d. h. 1 Teil Leim bindet 0,72 Teile Tannin.

Zur Rückstandsbestimmung wurde das 3fache Quantum gemischt. 15 ccm Filtrat ergaben zur Trockne gebracht bei 100° einen Rückstand von 0,00235 g (im Mittel aus 2 Bestimmungen), daraus berechnet sich, daß 1 Teil Leim 0,67 Teile Tannin gebunden hatte.

Tabelle IV.

Grenzzahlen für Leim IV.

Versuchsreihe	Art der Ausführung	Alter der Leimlösung: Frisch	24h	48h	72h	96h	120h	144h	Konzentration der Leimlösung %
		Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin							
1	Nicht geschüttelt	0,63	0,30	0,28	0,25	0,23	—	0,18	0,40
2	Nicht geschüttelt	0,56	0,26	—	0,19	—	—	—	0,43
	Geschüttelt	0,54	0,26	—	0,21	—	—	—	
3	Nicht geschüttelt	0,56	0,28	—	0,23	0,21	—	—	0,43
	Geschüttelt	0,56	0,26	—	0,23	0,21	—	—	
4	Nicht geschüttelt	0,59	0,32	0,29	0,27	0,24	0,18	—	0,34
	Geschüttelt	0,62	0,29	0,29	0,24	0,21	0,18	—	
5	Nicht geschüttelt	0,59	0,28	0,26	0,23	0,21	—	—	0,39
	Geschüttelt	0,56	0,31	0,28	0,23	0,21	—	—	
6	Nicht geschüttelt	0,56	0,28	0,26	—	—	—	—	0,50
	Geschüttelt	0,54	0,30	0,24	—	—	—	—	

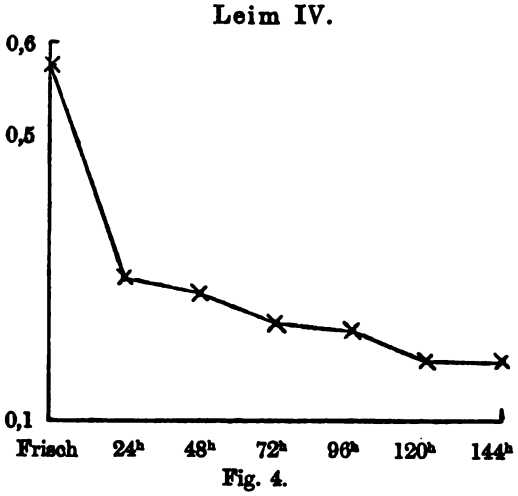


Fig. 4.

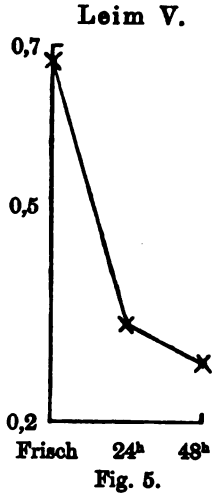


Fig. 5.

Tabelle V.

Grenzzahlen für Leim V.

Versuchsreihe	Art der Ausführung	Alter der Leimlösung: Frisch	24h	48h	72h	96h	120h	144h	Konzentration der Leimlösung %
		Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin							
1	Nicht geschüttelt	0,67	0,31	0,26	—	—	—	—	0,39
	Geschüttelt	0,67	0,31	0,23	—	—	—	—	
2	Nicht geschüttelt	0,67	0,37	0,33	—	—	—	—	0,30
	Geschüttelt	0,70	0,33	0,30	—	—	—	—	
3	Nicht geschüttelt	0,68	0,34	0,29	—	—	—	—	0,38
	Geschüttelt	0,66	0,34	0,29	—	—	—	—	

Tabelle VI.

Mittelwerte der Grenzzahlen für Leim I bis Leim V.

Leimsorte	Art der Ausführung	Alter der Leimlösung						
		Frisch	24h	48h	72h	96h	120h	144h
		Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin						
I	Nicht geschüttelt	0,76	0,47	0,41	0,37	0,37	0,34	0,34
	Geschüttelt	0,76	0,48	0,39	0,32	0,27	0,27	—
	Mittel	0,76	0,48	0,41	0,35	0,32	0,31	0,34
II	Nicht geschüttelt	0,80	0,56	0,55	0,50	0,48	—	0,41
	Geschüttelt	0,83	—	—	—	—	—	—
	Mittel	0,81	0,56	0,55	0,50	0,48	—	0,41
III	Nicht geschüttelt	0,70	0,38	0,35	0,36	0,32	0,30	0,32
	Geschüttelt	0,68	0,37	0,33	0,34	0,31	0,29	0,28
	Mittel	0,69	0,37	0,34	0,35	0,31	0,30	0,30
IV	Nicht geschüttelt	0,58	0,29	0,27	0,23	0,22	0,18	0,18
	Geschüttelt	0,56	0,28	0,27	0,23	0,21	0,18	—
	Mittel	0,56	0,29	0,27	0,23	0,22	0,18	0,18
V	Nicht geschüttelt	0,67	0,34	0,29	—	—	—	—
	Geschüttelt	0,68	0,33	0,27	—	—	—	—
	Mittel	0,68	0,33	0,28	—	—	—	—

Berücksichtigt man, daß zwischen der Titrierung und der Rückstandsbestimmung notwendigerweise einige Zeit verstreichen muß, in der der Titer der Leimlösung sich vermindert, so ist obiges Ergebnis zu verstehen. Das Filtrat hatte sich dementsprechend als schwach tanninhaltig erwiesen.

2. Rückstandsbestimmung. Die zur vorstehenden Bestimmung benutzte Leimlösung ergab 24h später den Grenzfall bei 10 ccm Leimlösung + 2,0 ccm Tanninlösung, d. h. es bindet 1 Teil Leim 0,43 Teile Tannin.

Die wie oben ausgeführte Rückstandsbestimmung ergab für 15 ccm Filtrat 0,0013 g Trockenrückstand, so daß 1 Teil Leim 0,41 Teile Tannin bindet.

Das Filtrat erwies sich als minimal tanninhaltig.

3. Rückstandsbestimmung. Die oben verwendete Leimlösung ergab 48h alt den gleichen Grenzfall und das gleiche Resultat bei der Rückstandsbestimmung wie am Tage zuvor.

Zusammengestellt sind die Ergebnisse der 3 Bestimmungen folgende:

Alter der Leimlösung:	Frisch	24h	48h
Grenzzahl durch Titrierung:	0,72	0,43	0,43
„ „ Rückstandsbestimmung:	0,67	0,41	0,41

Wenngleich absolute Übereinstimmung nicht erzielt ist, so findet die beträchtliche Verminderung des Bindungsvermögens

des Leims für Tannin innerhalb der ersten 24h doch eine gewichtsanalytische Bestätigung. Die Abweichungen sind einerseits bedingt durch die Zustandsänderung der frischen Leimlösung, andererseits durch die Schwierigkeiten, mit denen die Erzielung des Grenzfalles bei Anwendung größerer Volumina verbunden ist. (Man vgl. hierzu S. 480 bis 481.)

Zuletzt sei noch mitgeteilt, daß auch längere Zeit erhitzte Leimlösungen (β-Leimlösungen) in den Bereich der Untersuchungen gezogen worden sind. Die Bestimmung des Tanninbindungsvermögens erwies sich jedoch für diesen Fall als unmöglich, indem die Ausflockung niemals eine vollständige ist, so daß das Filtrat immer Leim und Tannin zugleich enthielt.[1])

Im Anschluß an die Titrierungen sei bemerkt, daß die Zustandsänderung der Leimlösung schon vor langer Zeit beobachtet wurde.

v. Fehling[2]) benutzte zu der Gerbstoffbestimmung eine 1%ige Leimlösung. Dabei fand er, daß er von der frisch bereiteten Leimlösung zur Fällung von 0,2 g Galläpfelgerbsäure 33 ccm, von der einige Tage alten hingegen 35 bis 40 ccm brauchte.

Nimmt man 33 ccm und 40 ccm als die weitesten Grenzen an, so ist die Grenzzahl seiner frischen Lösung 0,61, die der gealterten 0,50.

Wie oben bemerkt wurde, erweist sich das Leimtannat des Grenzfalles als wasserunlöslich und wasserbeständig. Verläuft hingegen die Reaktion zwischen Leim und Tannin bei einem Überschuß von letzterem, so resultiert ein wasserunbeständiges Leimtannat, wie später eingehend gezeigt werden wird.

Bei der Ermittelung der Zusammensetzung dieses unbeständigen Tannates wurde von der früher erwähnten Tatsache Gebrauch gemacht, daß ein bei Gegenwart von überschüssigem Tannin bereitetes Leimtannat ein nur tanninhaltiges, niemals aber auch leimhaltiges Filtrat liefert. Es wurde demgemäß eine bekannte Menge Leim in wässeriger Lösung mit einem Überschuß von Tannin versetzt, in einem aliquoten Teile des Filtrates das nicht gebundene Tannin bestimmt und daraus die Menge des vom Leim zurückgehaltenen Tannins berechnet. Dazu war jedoch er-

[1]) Eine ähnliche Beobachtung wurde von A. Müller gemacht. Zeitschr. f. angew. Chem. 15, 1237, 1903.

[2]) Wagners Jahresber. d. chem. Technologie 1858, 512.

forderlich, zunächst festzustellen, ob beim Zusammenbringen von Leim und Tannin sofort oder erst nach einiger Zeit Gleichgewicht eintritt und ob dabei in gewissen Grenzen die Temperatur von Einfluß ist. Es seien deshalb zuerst diese Gleichgewichtsversuche beschrieben.

Das Material ist Leim I und Tannin III, alle Werte beziehen sich auf bei 100° getrocknete Substanz, die Leimlösung war stets frisch bereitet.

1. Gleichgewichtsversuche bei Zimmertemperatur. (16 bis 17°.)

Diese Versuche führte ich in Glasstöpselflaschen aus und brachte gleichzeitig in drei Gefäße eine bestimmte Menge Leim- und Tanninlösung.

Das erste Reaktionsgemisch filtrierte ich nach kräftigem Umschütteln sofort ab, das zweite ließ ich 3^h, das dritte 6^h unter öfterem Umschütteln stehen.

Versuchsreihe A.

Von einer 1%igen Tanninlösung setzte ich 30 ccm zu 40 ccm 0,6%iger Leimlösung, so daß auf 1 Teil Leim 1,25 Teile Tannin zur Verwendung gelangten. Von den Filtraten brachte ich je 30 ccm zur Trockne, der Trockenrückstand bei 100° betrug 0,0077, 0,0079 und 0,0074 g (im Mittel aus 2 Bestimmungen).

Daraus berechnet sich;

1. Versuch, sofort filtriert: 1 Teil Leim bindet 1,18 Teile Tannin
2. „ nach 3^h „ 1 „ „ „ 1,17 „ „
3. „ „ 6^h „ 1 „ „ „ 1,18 „ „

Versuchsreihe B.

40 ccm 0,42%ige Leimlösung wurden mit 30 ccm 1%iger Tanninlösung versetzt, so daß Leim und Tannin im Verhältnis 1,0 zu 1,79 stehen.

Die Rückstände von je 30 ccm Filtrat betrugen 0,0176, 0,0173 und 0,0178 g, woraus sich ergibt:

1. Versuch, sofort filtriert: 1 Teil Leim bindet 1,54 Teile Tannin
2. „ nach 3^h „ 1 „ „ „ 1,55 „ „
3. „ „ 6^h „ 1 „ „ „ 1,54 „ „

2. Gleichgewichtsversuche bei konstanter Temperatur.

Die Reaktionsgemische wurden bis zum Abfiltrieren bei konstanter Temperatur im Wasserthermostat belassen und geschüttelt.

Die Temperatur betrug 25°, den ersten Versuch beließ ich 30', den zweiten 4^h, den dritten 7^h im Thermostat.

Versuchsreihe A.

40 ccm 0,6%ige Leimlösung wurden mit 30 ccm 1%iger Tanninlösung versetzt, Leim und Tannin stehen also im Verhältnis 1,0:1,25.

Die Rückstände von je 30 ccm Filtrat betrugen 0,0079, 0,0079 und 0,0082 g. Daraus ergibt sich:

1. Versuch, nach 30′ filtriert: 1 Teil Leim bindet 1,17 Teile Tannin
2. „ „ 4h „ 1 „ „ „ 1,17 „ „
3. „ „ 7h „ 1 „ „ „ 1,17 „ „

Versuchsreihe B.

8 ccm 0,6%ige Leimlösung werden mit 32 ccm Wasser verdünnt und 30 ccm 1%ige Tanninlösung zugefügt, so daß Leim und Tannin im Verhältnis von 1,0 zu 6,25 zur Verwendung kamen. Je 30 ccm Filtrat lieferten 0,0868, 0,0878 und 0,0872 g Trockenrückstand. Daraus resultiert:

1. Versuch, nach 30′ filtriert: 1 Teil Leim bindet 2,03 Teile Tannin
2. „ „ 4h „ 1 „ „ „ 1,98 „ „
3. „ „ 7h „ 1 „ „ „ 2,01 „ „

Versuchsreihe C.

4 ccm 0,6%ige Leimlösung wurden mit 36 ccm Wasser verdünnt und mit 30 ccm 1%iger Tanninlösung versetzt, d. h. Leim und Tannin stehen im Verhältnis von 1,0:12,50. Je 30 ccm Filtrat ergaben 0,1068, 0,1061 und 0,1072 g Rückstand, so daß sich folgendes Resultat daraus berechnet:

1. Versuch, nach 30′ filtriert: 1 Teil Leim bindet 2,12 Teile Tannin
2. „ „ 4h „ 1 „ „ „ 2,19 „ „
3. „ „ 7h „ 1 „ „ „ 2,08 „ „

Diese Versuche zeigten, daß beim Zusammenbringen von Leim und Tannin in wässeriger Lösung in kurzer Zeit Gleichgewicht eintritt und daß die Temperatur innerhalb gewisser Grenzen (16 bis 25°) keinen Einfluß auszuüben vermag.

Somit waren die Bedingungen erfüllt, unter denen die Untersuchung des nicht wasserbeständigen Leimtannates in der oben angegebenen Weise durchführbar erschien.

Versuchsreihe A.

Das Material ist Leim I und Tannin III, die Leimlösung war bei allen Versuchen frisch.

Alle Proben wurden 1h bei 25° im Thermostat geschüttelt, alle Werte beziehen sich auf bei 100° getrocknete Substanz.

Als Ausgangsmaterial diente teils 1%ige, teils 2%ige Tanninlösung und 0,6%ige Leimlösung.

Um bei allen Proben das gleiche Flüssigkeitsquantum (60 ccm) zu haben, wurde die Leimlösung wenn nötig mit Wasser verdünnt.

Zur Ermittlung des nicht gebundenen Tannins brachte ich 30 ccm Filtrat zur Trockne.

In dieser Weise habe ich 17 Versuche ausgeführt und dabei den Tanninüberschuß allmählich gesteigert. In der umstehenden oberen Tabelle finden sich die Resultate sowie die analytischen Daten dieser Untersuchungen.

Wie ersichtlich wächst das Bindungsvermögen des Leims für Tannin mit steigendem Tanninüberschuß, um bei Verwen-

dung von 15 Teilen Tannin auf 1 Teil Leim (Vers. 13) seinen maximalen Wert zu erreichen.

Untenstehende graphische Darstellung veranschaulicht die Ergebnisse dieser Versuchsreihe.

Es sind auf der Abszisse die auf 1 Teil Leim angewendeten, auf der Ordinate die von 1 Teil Leim gebundenen Teile Tannin aufgetragen.

Nr. d. Versuchs	Leimlösung	Tanninlösung	Rückstand bei 100° von 30 ccm Filtrat in g (im Mittel aus 2 Bestimmungen)	Teile Tannin, die auf 1 Teil Leim in Anwendung kamen	Teile Tannin, die von 1 Teil Leim gebunden wurden
1	40 ccm 0,6% + 8 ccm H_2O	12 ccm 2%	0,0045	1	0,96
2	15 „ 0,6 „ + 27 „ „	18 „ 1 „	0,02045	2	1,55
3	20 „ 0,6 „ + 4 „ „	36 „ 1 „	0,0804	3	1,66
4	15 „ 0,6 „ + 9 „ „	36 „ 1 „	0,09385	4	1,91
5	15 „ 0,6 „	45 „ 1 „	0,1329	5	2,05
6	10 „ 0,6 „ + 14 „ „	36 „ 1 „	0,11805	6	2,07
7	10 „ 0,6 „ + 8 „ „	42 „ 1 „	0,14435	7	2,19
8	10 „ 0,6 „ + 2 „ „	48 „ 1 „	0,17665	8	2,11
9	5 „ 0,6 „ + 28 „ „	27 „ 1 „	0,1040	9	2,07
10	5 „ 0,6 „ + 25 „ „	30 „ 1 „	0,1150	10	2,34
11	10 „ 0,6 „ + 17 „ „	33 „ 2 „	0,2531	11	2,56
12	10 „ 0,6 „ + 14 „ „	36 „ 2 „	0,28175	12	2,61
13	10 „ 0,6 „ + 5 „ „	45 „ 2 „	0,36325	15	2,89
14	10 „ 0,6 „ + 2 „ „	48 „ 2 „	0,3959	16	2,80
15	5 „ 0,6 „ + 25 „ „	30 „ 2 „	0,2594	20	2,71
16	5 „ 0,6 „ + 17,5 „ „	37,5 „ 2 „	0,33625	25	2,58
17	5 „ 0,6 „ + 10 „ „	45 „ 2 „	0,40855	30	2,76

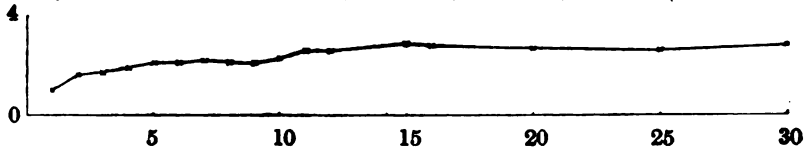


Fig. 6.

Versuchsreihe B.

Die Temperatur betrug hier 30° konstant, alle übrigen Bedingungen sind die gleichen wie unter A.

Nr. d. Versuchs	Leimlösung	Tanninlösung	Rückstand bei 100° von 30 ccm Filtrat in g (im Mittel aus 2 Bestimmungen)	Teile Tannin, die auf 1 Teil Leim in Anwendung kamen	Teile Tannin, die von 1 Teil Leim gebunden wurden
1	40 ccm 0,6% + 8 ccm H_2O	12 ccm 2%	0,0044	1	0,96
2	15 „ 0,6 „ +	45 „ 1 „	0,13235	5	2,06
3	10 „ 0,6 „ + 14 „ „	36 „ 2 „	0,2790	12	2,70
4	10 „ 0,6 „ + 5 „ „	45 „ 2 „	0,36605	15	2,80
5	10 „ 0,6 „ + 2 „ „	48 „ 2 „	0,3973	16	2,76
6	5 „ 0,6 „ + 25 „ „	30 „ 2 „	0,25725	20	2,85
7	5 „ 0,6 „ + 17,5 „ „	37,5 „ 2 „	0,3340	25	2,73

Hier erreicht die gebundene Menge Tannin ihren größten Wert bei Verwendung von 20 Teilen Tannin auf 1 Teil Leim (Versuch 6).

Im übrigen stimmen jedoch die Resultate dieser Versuchsreihe mit denen der vorherigen innerhalb der erreichbaren Genauigkeit überein, so daß der weiteren Steigerung der Temperatur um 5° keine Bedeutung beigemessen werden kann.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe ergeben graphisch dargestellt folgende Kurve:

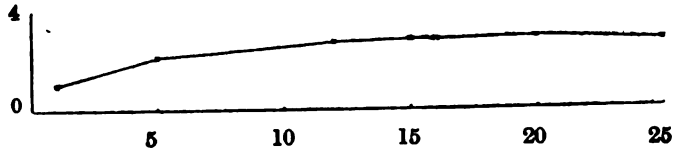


Fig. 7.

Versuchsreihe C.

Das Material ist Leim I und Tannin II, die Leimlösung war bei allen Versuchen frisch.

Alle Proben wurden bis zum Abfiltrieren 30′ bei Zimmertemperatur belassen und öfters umgeschüttelt. Zu jedem Versuch dienten 10 ccm 0,5%ige Leimlösung, diese wurden jeweils so weit mit Wasser verdünnt, daß das Flüssigkeitsquantum immer 40 ccm betrug.

Nr. des Versuchs	Leimlösung 0,5% ccm	H_2O ccm	Tanninlösung 5% ccm	Rückstand bei 100° von 20 ccm Filtrat g	Teile Tannin, die auf 1 Teil Leim in Anwendung kamen	Teile Tannin, die von 1 Teil Leim gebunden wurden
1	10	29	1	0,0019	1	0,92
2	10	28	2	0,0166	2	1,34
3	10	26	4	0,0559	4	1,76
4	10	24	6	0,1002	6	1,99
5	10	22	8	0,1454	8	2,18
6	10	20	10	0,1940	10	2,24
7	10	18	12	0,2378	12	2,49
8	10	16	14	0,2862	14	2,55
9	10	15	15	0,3105	15	2,58
10	10	14	16	0,3297	16	2,81
11	10	12	18	0,3778	18	2,89
12	10	10	20	0,4210	20	3,16
13	10	5	25	0,5412	25	3,35
14	10	0	30	0,6678	30	3,29

Wie ersichtlich, tritt die maximale Bindung bei dieser Versuchsreihe erst bei Verwendung von 25 Teilen Tannin auf 1 Teil Leim ein (Versuch 13).

Die Ergebnisse der vorstehenden Reihe sind in folgendem Diagramm vereinigt.

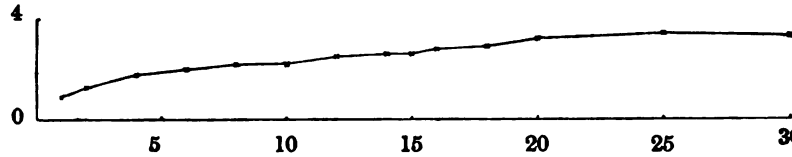


Fig. 8.

Versuchsreihe D.[1])

Das Material ist Leim II und Tannin II, die Leimlösung war frisch bereitet.

Die Versuche sind bei Zimmertemperatur ausgeführt, zu jeder Probe wurden 10 ccm 0,386%ige Leimlösung verwendet, die Tanninlösung wurde so weit mit Wasser verdünnt, daß das Volumen überall 20 ccm betrug.

Nr. des Versuchs	Leimlösung 0,386% ccm	Tanninlösung 4,96% ccm	H_2O ccm	Rückstand bei 100° von 10 ccm Filtrat	Teile Tannin, die auf 1 Teil Leim in Anwendung kamen	Teile Tannin, die von 1 Teil Leim gebunden wurden
1	10	0,7	9,3	0,0004	0,85	0,83
2	10	0,8	9,2	0,0010	0,97	0,92
3	10	1,0	9,0	0,0015	1,22	1,14
4	10	1,5	8,5	0,0080	1,82	1,41
5	10	2,0	8,0	0,0147	2,43	1,67
6	10	2,5	7,5	0,0255	3,04	1,72
7	10	5,0	5,0	0,0700	6,08	2,45
8	10	10,0	0	0,1840	12,15	2,62

Nachstehende graphische Darstellung gibt die Resultate dieses Versuches wieder.

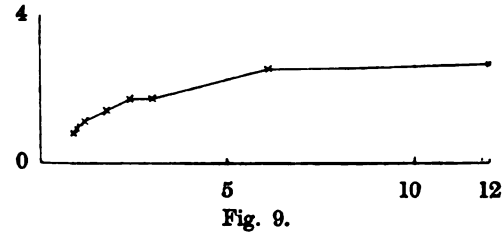


Fig. 9.

Es folgen jetzt noch 3 Versuchsreihen, die mit gealterter Leimlösung ausgeführt sind. Das Material ist überall Leim I und Tannin III.

[1]) Dieser bereits im Jahre 1906 von Herrn Geheimrat Professor Dr. Boehm ausgeführte Versuch wurde mir von ihm gütigst überlassen.

Um zunächst festzustellen, ob bei Verwendung von überschüssigem Tannin die Menge des gebundenen Tannins vom Alter der Leimlösung abhängig ist, sind die beiden zunächst folgenden Versuchsreihen E und F so angeordnet, daß nicht der Tanninüberschuß, sondern das Alter der Leimlösung variiert wurde. Alle Proben wurden 1^h bei 25° im Thermostat geschüttelt.

Versuchsreihe E.

30 ccm 1%ige Tanninlösung wurden zu je 30 ccm frischer 24, 48 und 72^h alter 0,405%iger Leimlösung gegeben, so daß Leim und Tannin im Verhältnis von 1,0 zu 2,47 stehen.

Je 30 ccm Filtrat ergaben 0,0525, 0,0544, 0,0554 und 0,0576 g Trockenrückstand (im Mittel aus 2 Bestimmungen). Daraus folgt:

Alter der Leimlösung:	Frisch	24^h	48^h	72^h
Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin:	1,61	1,58	1,56	1,53

Versuchsreihe F.

30 ccm 1%ige Tanninlösung wurden zu je 30 ccm frischer 24 und 72^h alter 0,416%iger Leimlösung gegeben, Leim und Tannin stehen also im Verhältnis von 1,0 zu 2,40.

Je 30 ccm Filtrat lieferten 0,0497, 0,0517 und 0,0536 g Trockenrückstand (im Mittel aus 2 Bestimmungen). Daraus ergibt sich:

Alter der Leimlösung:	Frisch	24^h	72^h
Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin:	1,61	1,58	1,54

Somit läßt sich aussagen, daß auf die Zusammensetzung des nicht wasserbeständigen Leimtannates das Alter der Leimlösung nur von unwesentlichem Einfluß ist.

Denn aus Versuchsreihe A (S. 474) läßt sich interpolieren, daß bei Verwendung von 2,5 Teilen Tannin auf 1 Teil frischen Leim annähernd 1,6 Teile Tannin von 1 Teil Leim gebunden werden.

Dieses Mischungsverhältnis lag annähernd auch den obigen Versuchen mit gealtertem Leim zugrunde, in der Tat liegen auch dort die Ergebnisse in der Nähe des Wertes 1,6.

Versuchsreihe G.

Diese Reihe schließt sich den beiden vorigen insofern ergänzend an, als eine Leimlösung von bestimmtem Alter mit wechselndem Tanninüberschusse versetzt wurde. Die Reaktionsgemische wurden 30′ bei Zimmertemperatur belassen, öfters umgeschüttelt und abfiltriert.

Die verwendete Leimlösung war 48^h alt.

Nr. des Versuchs	Leimlösung	Tanninlösung	Rückstand v. 30 ccm Filtrat g	Teile Tannin, die auf 1 Teil Leim in Anwendung kamen	Teile Tannin, die von 1 Teil Leim gebunden wurden
1	15 ccm 0,6%	45 ccm 1%	0,1383	5	1,93
2	5 „ 0,6 „ + 25 ccm H_2O	30 „ 1 „	0,1196	10	2,00
3	10 „ 0,6 „ + 5 „ „	45 „ 2 „	0,3706	15	2,64

Innerhalb der erreichbaren Genauigkeit stimmen auch diese Werte mit den entsprechenden der Versuchsreihe A (S. 474) überein, so daß man in der Tat die Zusammensetzung des nicht wasserbeständigen Leimtannates als vom Alter der Leimlösung unabhängig bezeichnen darf.

Es steht dies Verhalten im Gegensatz zu dem des wasserbeständigen Tannates, dessen Zusammensetzung, wie im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, mit dem Alter der Leimlösung veränderlich ist.

Das Resultat läßt sich auch so ausdrücken, daß jenseits des Grenzfalles, also in diesem Sinne bei einem Überschuß von Tannin in der Lösung, das Bindungsvermögen des Leims für Tannin von seinem Alter unabhängig ist.

Es erübrigt noch eine kurze Betrachtung über die Höhe des erreichbaren Maximums der gebundenen Menge Tannin.

Dazu seien von den Versuchsreihen A, B und C die Einzelwerte mit der größten Menge gebundenen Tannins zusammengestellt.

Versuchsreihe	Auf 1 Teil Leim angewendete Teile Tannin	Von 1 Teil Leim gebundene Teile Tannin
A	15	2,89
B	20	2,85
C	25	3,35

Als Durchschnittsergebnis erhält man daraus, daß bei Verwendung von 20 Teilen Tannin 3,03 Teile von 1 Teil Leim gebunden werden.

Nicht unerwähnt mag bleiben, daß die variable Zusammensetzung des bei einem Überschuß von Tannin bereiteten Leimtannates schon früher beobachtet worden ist.

Löwenthal[1]) hatte eine Gerbstoffbestimmung vermittels Leimlösung ausgearbeitet und schließt eine diesbezügliche Veröffentlichung mit folgenden Worten:

„Ich habe wiederholt versucht, meine Gerbstoffbestimmung umgekehrt zur Leimbestimmung anzuwenden, indem ich eine bestimmte Quantität Leim mit einem Überschuß von Tannin fällte, filtrierte und im Filtrat den Gerbstoff bestimmte. Es scheiterten aber diese Versuche daran, daß bei steigender Quantität Gerbstoff auch der gebundene Gerbstoff sich vermehrte, und zwar derart, daß ich bis heute noch kein Maximum feststellen konnte."

II. Eigenschaften des Leimtannates.

A. Wasserbeständiges Leimtannat aus frisch bereiteter Leimlösung.

Noch feucht mit Wasser übergossen und 60′ bei Zimmertemperatur damit in Berührung gelassen, liefert ein solches

[1]) Zeitschr. f. anal. Chem. 16, 33, 1877.

Leimtannat ein Filtrat, in dem mit Eisenchlorid- und Kaliumquecksilberjodidlösung Tannin und Leim nicht nachweisbar sind. Digeriert man das noch feuchte Tannat 20′ mit Wasser von 40 bis 55°, so erweist sich das Filtrat gleichfalls als von nachweisbaren Spuren von Leim und Tannin frei. Schüttelt man aber das Leimtannat nur wenige Minuten mit Alkohol, so erhält man ein stark tanninhaltiges Filtrat.

Behandelt man ein solches Tannat fortgesetzt mit Alkohol von 40 bis 60° unter oftmaliger Erneuerung des Alkohols, so läßt sich dem Leimtannat fast sämtliches Tannin entziehen. Digeriert man dann den verbliebenen Rest des Leimtannates 30′ mit wenig Wasser von 40° und engt den abfiltrierten Auszug bei mäßiger Wärme ein, so erhält man nach einigem Stehen eine Gallerte, die sich bei gelindem Erwärmen zur klaren Flüssigkeit löst und nach dem Erkalten wieder erstarrt.

In einem speziellen Falle gelang es, einem solchen wasserbeständigen Leimtannat von der Zusammensetzung 1 Teil Leim zu 0,67 Teilen Tannin (0,086 g Leim und 0,058 g Tannin) 97,94% Tannin (0,0568 g) zu entziehen.

Sämtliche alkoholischen Auszüge enthielten allerdings etwas Gallussäure, die als Tannin mit in Rechnung gestellt ist. Da jedoch die Rückstände der alkoholischen Auszüge in wenig Wasser gelöst auf Zusatz von Leimlösung starke Ausflockung zeigten, kann man sie recht wohl als in der Hauptsache aus Tannin bestehend ansprechen. Andererseits läßt sich durch Behandeln des Rückstandes der Alkoholauszüge mit Äther die Gallussäure kristallinisch erhalten.

Die in diesem Falle in der oben beschriebenen Weise erhaltene Gallerte gab, in Lösung gebracht, alle Leimreaktionen, hingegen ließ sich Tannin darin nicht nachweisen.

B. Wasserbeständiges Leimtannat aus gealterter Leimlösung.

Noch feucht mit Wasser übergossen und 60′ bei Zimmertemperatur damit in Berührung gelassen, liefert ein solches Leimtannat ein Filtrat, in dem sich Leim und Tannin mit Kaliumquecksilberjodid- resp. Eisenchloridlösung nicht nachweisen lassen.

Digeriert man das noch feuchte Tannat 20′ mit Wasser von 40°, so enthält das Filtrat Leim, jedoch keine nachweisbaren Spuren Tannin.

Schüttelt man ein solches Leimtannat nur wenige Minuten mit Alkohol, so erweist sich das Filtrat als stark tanninhaltig.

Es gelingt nicht, ein wasserbeständiges, aus gealterter Leimlösung bereitetes Tannat in ein solches von der Zusammensetzung des aus frischer Leimlösung bereiteten überzuführen, indem man dem in Wasser suspendierten Leimtannat noch so viel Tannin zusetzt, als das aus frischer Leimlösung bereitete mehr bindet.

Es resultiert vielmehr ein nicht wasserbeständiges Tannat, indem es bei Zimmertemperatur geringe, beim Erwärmen größere Mengen Tannin an Wasser abgibt.

C. Allgemeine Bemerkungen über das wasserbeständige Leimtannat.

Suspendiert man ein solches Leimtannat noch feucht in etwas Wasser und versetzt mit wenig Eisenchloridlösung, so färben sich die einzelnen Flocken intensiv blau, indes die Flüssigkeit nur die schwach gelbliche Farbe des Eisenchlorids aufweist. Dies Verhalten ist für das wasserbeständige Leimtannat charakteristisch.

In Eisessig ist das frisch gefällte Leimtannat etwas, in verdünnter Sodalösung hingegen rasch und vollständig löslich. Fügt man nach erfolgter Lösung sofort eine verdünnte Säure bis zur schwach sauren Reaktion hinzu, so scheidet sich ein flockiger, aus anscheinend unverändertem Leimtannat bestehender Niederschlag ab. Das Filtrat enthält keine nachweisbaren Spuren von Leim und Tannin.

Getrocknet erweist sich das wasserbeständige Leimtannat nicht nur resistent gegen die Behandlung mit Wasser, sondern auch gegen Alkohol.

Erwärmt man es hingegen 3^h auf 100° oder läßt es 24^h in Berührung mit Wasser, so zersetzt es sich unter Abspaltung von Gallussäure.

Die Herstellung größerer Mengen wasserbeständigen Leimtannates begegnet erheblichen Schwierigkeiten.

Zunächst ist es praktisch unausführbar, zwei Lösungen, die miteinander in Reaktion treten sollen, momentan völlig zu vermischen. Dies ist aber bei der Bereitung des wasserbeständigen Tannates erforderlich; denn setzt man z. B. der Leimlösung nach und nach die Tanninlösung zu, so besteht die Möglichkeit, daß sich der Leim an der Einflußstelle der Tanninlösung mit so viel Tannin beladet, daß es zur Bildung des nicht wasserbeständigen Tannates kommt.

Ganz sicher tritt dies ein, wenn man umgekehrt der Tanninlösung die Leimlösung zusetzt.

Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß das Leimtannat zuweilen nicht ausflockt, sondern in so feiner Verteilung in der Flüssigkeit suspendiert bleibt, daß seine Isolierung auf keine Weise gelingt.

Immerhin gelang es, solche beständige Tannate einige Male in Mengen von 2 bis 3 g (lufttrocken) herzustellen.

An einem derselben wurde die Zusammensetzung durch Bestimmung des Stickstoffgehaltes kontrolliert. Die nach Kjeldahl ausgeführte Stickstoffanalyse ergab folgende Werte:

Leimtannat bei 100° konstant in g	Gebundene Menge $\frac{H_2SO_4}{n\,10}$ in ccm	N %	Leim %
0,2726	22,00	11,30	61,81
0,3381	26,50	10,97	60,03

Zur Berechnung des Leimgehaltes war der Stickstoffgehalt des zu dem Leimtannat verwendeten Leimes V ermittelt und zu 18,28% gefunden worden.

Die Titrierung, auf Grund deren das Leimtannat hergestellt worden war, hatte ergeben, daß 1 Teil Leim an 0,71 Teile Tannin gebunden ist, woraus sich sein Leimgehalt zu 58,48%, sein Stickstoffgehalt zu 10,69% berechnet.

Mit diesen Werten stimmen die durch Analyse gefundenen hinreichend genau überein.

D. Verhalten des nicht wasserbeständigen Leimtannates gegen Wasser.

Behandelt man ein solches, bei einem Überschuß von Tannin hergestelltes Tannat noch feucht nur wenige Minuten mit etwas Wasser, so erhält man ein stark tanninhaltiges

Filtrat. Diese Tanninabgabe vermindert sich auch bei wochenlanger Behandlung mit Wasser nicht merklich.

Nach vorherigem Trocknen wird Tannin an kaltes Wasser viel langsamer, an heißes Wasser reichlicher abgegeben.

Wie das wasserbeständige Leimtannat, so wird auch das nicht wasserbeständige, getrocknete Leimtannat durch Erhitzen auf 100° oder durch längere Einwirkung von Wasser unter Abspaltung von Gallussäure zerlegt.

E. Verhalten des nicht wasserbeständigen Leimtannates gegen Alkohol.

Behandelt man ein solches Leimtannat noch feucht nur wenige Minuten mit Alkohol, so erweist sich das Filtrat als sehr stark tanninhaltig.

In einem speziellen Falle wurde die Zerlegung eines nicht wasserbeständigen Tannates durch Alkohol quantitativ verfolgt.

Das noch feuchte Leimtannat wurde mit Alkohol übergossen und mehrere Tage hindurch mit immer neuen Mengen Alkohol bei 60° behandelt.

Es gelang so, dem Leimtannat (bestehend aus 1,0 g Leim und 1,55 g Tannin) 1,4463 g oder 93,29% des gebundenen Tannins zu entziehen.

Allerdings fand sich in allen Alkoholrückständen stets eine geringe Menge Gallussäure, die als Tannin mit in Rechnung gestellt ist, während sich die Hauptmenge des Rückstandes als aus (durch Leimlösung fällbarem) Tannin bestehend erwies.

Bemerkenswert ist, daß die letzten Reste Tannin dem Leimtannat äußerst hartnäckig anhaften und eine völlig quantitative Zerlegung des Leimtannates in seine Komponenten nahezu ausschließen.

Aus dem verbliebenen Anteil des Leimtannates konnte durch Behandlung mit wenig Wasser von 40° und Einengen des erhaltenen Auszuges eine Gallerte gewonnen werden.

Der Trockenrückstand derselben betrug 0,0608 g, so daß vom vorhandenen Leim ungefähr 6%, also nur wenig in Lösung gegangen war.

In Wasser gelöst, gab die Gallerte alle Leimreaktionen und zeigte starke Linksdrehung, die innerhalb 24^h von $-117°$

bis — 187° anstieg, welches Verhalten, wie später gezeigt werden soll, für den Leim charakteristisch ist.

Zu bemerken ist ferner, daß nur zwei wässerige Auszüge des verbliebenen Teiles des Leimtannates eine Gallerte lieferten. In den übrigen Auszügen fand sich zwar auch Leim oder wenigstens ein leimähnlicher Körper, die in Lösung gehende Menge wurde aber sehr bald außerordentlich gering.

Das demnach fast als unlöslich zu bezeichnende Leimtannat bildete in diesem Stadium eine dunkelbraune, zähe, kautschukähnliche Masse, die sich zu Fäden ausziehen ließ und sich in Eisenchloridlösung alsbald blau färbte.

Auch nach vorherigem Trocknen gibt nicht wasserbeständiges Leimtannat Tannin an Alkohol ab, und zwar reichlicher als an Wasser, wie nachfolgender Versuch lehrt.

Je 0,3 g eines solchen Leimtannates wurden mit 30 ccm Wasser und 30 ccm Alkohol 5^h auf 60° erwärmt.

Die Rückstände der Auszüge betrugen (bei 100° getrocknet) 0,0075 g und 0,0200 g, stehen also im Verhältnis von 1,0:2,67. —

Titriert man in der eingangs angegebenen Weise eine Leimlösung mit gallussäurefreiem Tannin und prüft die Filtrate gleichzeitig mit Cyankaliumlösung auf Gallussäure, so erweisen sich alle Filtrate als etwas gallussäurehaltig, mit Ausnahme des Filtrates des Grenzfalles.

Es wird somit beim Zusammenbringen von wässerigen Lösungen von Leim und Tannin das letztere zu einem, wenn auch geringen, so doch nachweisbaren Teile zerlegt. Nur im Grenzfall ist die abgespaltene Menge Gallussäure so gering, daß sie sich dem Nachweis entzieht, sofern man nicht die Annahme macht, daß in diesem besonderen Falle die Bildung der Gallussäure überhaupt unterbleibt.

Das Auftreten von Gallussäure bei der Bereitung ist somit für das nicht wasserbeständige Leimtannat charakteristisch.

Zusammenfassung der Resultate.

Als Hauptergebnisse der Arbeit sind hervorzuheben:

1. Leim und Tannin lassen sich aus ihren wässerigen Lösungen quantitativ ausfällen.

Die gleiche Menge Leim erfordert in frisch bereiteter Lösung mehr Tannin zur Fällung als in 24 Stunden alter Lösung.

Im ersteren Falle wird 1 g Leim von ungefähr 0,7 g, im letzteren hingegen schon von ungefähr 0,4 g Tannin vollständig niedergeschlagen.

Diese Abnahme des Bindungsvermögens des Leims für Tannin in wässeriger Lösung ist umkehrbar insofern, als das Bindungsvermögen einer beliebig gealterten Leimlösung durch Erwärmen der letzteren wieder auf seinen ursprünglichen Wert gebracht werden kann.

Werden Leim und Tannin aus ihren Lösungen quantitativ abgeschieden, so entsteht ein wasserbeständiges Leimtannat.

2. Bei Gegenwart von überschüssigem Tannin wird von Leim eine weitere Menge Tannin (bis zu einem Maximum von ungefähr 3,0 Teilen Tannin auf 1 Teil Leim) gebunden.

In diesem Falle gibt das entstandene Leimtannat beim Behandeln des frisch gefällten Präparates mit Wasser unaufhörlich Tannin an das letztere ab.

3. Weder wasserbeständiges noch wasserunbeständiges Leimtannat läßt sich vollständig wieder in seine Komponenten zerlegen. Es gelingt aber durch anhaltende Behandlung mit Alkohol den beiden Leimtannaten bis zu 97% Tannin zu entziehen. Aus dem noch immer tanninhaltigen Rückstande lassen sich nur kleine Mengen (bis zu 6%) unveränderten (gelatinierbaren) Leims wiedergewinnen.

4. Bei andauernder Behandlung des wasserbeständigen sowie nicht wasserbeständigen Leimtannats mit Wasser oder Alkohol treten kleine Mengen Gallussäure auf.

Es erübrigt noch zu erörtern, inwieweit die vorstehenden Resultate auf Grund der bisherigen Ergebnisse der Kolloidchemie verwertbar sind.

Die Fällung von Leim durch Tannin ist früher vielfach als Salzbildung und der Niederschlag als eine Verbindung salzartiger Natur aufgefaßt worden.

Es ist nicht zu entscheiden, inwieweit bei der Ausflockung resp. Niederschlagsbildung Wasserentziehung eine Rolle spielt. Daß bei Einwirkung von Tannin auf Leim (besonders im Gelzustand) Wasserentziehung überhaupt stattfindet, ist längst bekannt. Ferner ist die Vermutung nicht von der Hand zu weisen, daß bei diesem Vorgang der Fällung resp. Wasserentziehung eine chemische Veränderung des Leims insofern

eintritt, als seine Löslichkeit in Wasser verändert wird. Daß dabei, wenn auch nur in geringem Umfange, auch das Tannin verändert, d. h. in Gallussäure verwandelt wird, geht aus den mitgeteilten Beobachtungen hervor.

Wenngleich also die Reaktion von Tannin auf Leim nicht ohne chemische Veränderung der beteiligten Komponenten zu verlaufen scheint, so sprechen meine Versuche doch entschieden dagegen, daß dabei eine Verbindung salzartigen Charakters resultiere.

Vielmehr stützen sie die Annahme, daß es sich dabei um physikalische Oberflächenwirkung, um Adsorptionsvorgänge handelt.

Gegen eine chemische Bindung spricht in erster Linie das verschiedene Bindungsvermögen des Leims in frischer und gealterter Lösung.

In zweiter Linie ist zu berücksichtigen, daß selbst das wasserbeständige Leimtannat durch Einwirkung von Alkohol rasch zerlegt wird.

Vor allem ließ aber die so weitgehend variable Zusammensetzung des nicht wasserbeständigen Leimtannates die Vermutung aufkommen, daß es sich bei dieser Reaktion nur um Adsorptionsvorgänge handele.

Diese Annahme war um so berechtigter, als man neuerdings festgestellt hat, daß die Bindung des Tannins durch Hautpulver dem Adsorptionsgesetz gehorcht.[1])

Es lag deshalb nahe, das Adsorptionsgesetz auch auf die Bindung des Tannins durch Leim anzuwenden. Dem begegneten jedoch einige Schwierigkeiten, über die nachstehend näheres mitgeteilt sei:

Die bisherigen Untersuchungen des Adsorptionsvorganges sind in der Weise ausgeführt, daß als Adsorbens ein fester, wohl charakterisierter Stoff (Kohle, Wolle, Seide usw.) diente.

In unserem Falle trifft dies nicht zu, da der Leim nicht trocken (und durch sein Gewicht definierbar), sondern nur gelöst in Reaktion gebracht werden konnte.

Eine feste Phase war also zunächst überhaupt nicht vorhanden, sie entstand vielmehr erst im Verlauf der Reaktion im Moment der Ausflockung.

[1]) Freundlich, Capillarchemie. Leipzig 1909. S. 531.

Darin liegt eine weitere Schwierigkeit insofern, als es nicht auszuschließen ist, daß sich die Oberfläche des ausgefällten Leims durch den Tanninzusatz in dem einen oder dem anderen Sinne ändert, und daß beide Komponenten außerdem einer (wenn auch geringen) chemischen Veränderung unterliegen. Denn, wie früher gesagt, wird der Leim wasserunlöslich, während das Tannin Gallussäure abspaltet.

Da konzentriertere Leimlösungen alsbald gelatinieren, konnte nur mit kleinen Mengen Leim gearbeitet werden, so daß an die experimentelle Genauigkeit keine allzu hohen Ansprüche gestellt werden konnten.

Letzten Endes ist die Bindung des Tannins durch den Leim nur in einem begrenzten Bereich meßbar, nämlich nur von dem Punkte ab, in dem alles aus der Lösung ausflockt, welcher Punkt im 1. Abschnitt vorliegender Abhandlung als „Grenzpunkt" genügend definiert worden ist und den man auch als „Ausflockungspunkt" bezeichnen kann.

Unterhalb dieses Ausflockungspunktes ist kein Wert meßbar, indem bei Gegenwart von überschüssigem Leim das Filtrat in überschüssigem Leim gelöstes Leimtannat enthält, so daß eine Rückstandsbestimmung des Filtrates unmöglich ist.

Deshalb konnten nur die bei Gegenwart von überschüssigem Tannin ausgeführten, im 1. Abschnitt beschriebenen Versuche in Frage kommen.

Die nachstehenden Ausführungen sollen zeigen, daß sich diese Versuche in der Tat im Sinne des Adsorptionsgesetzes verwerten lassen.

Der Berechnung wurde als Adsorptionsformel die Exponentialfunktion[1])

$$\frac{x}{m} = \beta \cdot c^{\frac{1}{p}}$$

zugrunde gelegt. In dieser Formel bedeutet x die adsorbierte Menge, c die Gleichgewichtskonzentration und m die adsorbierende Menge, während β und p von der Natur des gelösten Stoffes abhängige Konstanten sind.

Für das Adsorbens m pflegt man das Gewicht desselben in die Rechnung einzuführen. Aus schon erwähnten Gründen ist das für den

[1]) Freundlich, Über die Adsorption in Lösungen. Habilitationsschrift, Leipzig 1906, S. 10.

Leim nicht angängig, es mußte also m für eine Versuchsreihe konstant gewählt werden, da es dann aus der Rechnung herausfällt.

Dieser Voraussetzung war die Anordnung der in Abschnitt 1 mitgeteilten Versuche von vornherein insofern angepaßt, als entweder in den einzelnen Versuchsreihen überall ein konstantes Volum einer Leimlösung von gleichbleibender Konzentration Verwendung fand, oder als bei Versuch A, B und G, wo bei gleichfalls konstantem Gesamtvolumen Leimlösungen von verschiedener Konzentration Verwendung fanden, die einzelnen Beobachtungen auf die gleiche Einheit gelösten Leims umgerechnet wurden.

Den Berechnungen sind die Versuchsreihen A, B, C, D und G (S. 474, 475, 476, 477) zugrunde gelegt. Wie schon gesagt, ist in Versuchsreihe A, B und G die Menge des Leims variabel, so daß sich eine Umrechnung nötig machte. Die in diesen drei Versuchsreihen erhaltenen Resultate wurden dadurch verwertbar gemacht, daß überall 0,03 g Leim in 60 ccm Gesamtvolumen als Einheit angenommen wurde, die Resultate der Versuche, zu denen mehr Leim verwendet worden war, mußten also durch entsprechende Division verkleinert werden.

In den folgenden Tabellen sind die auf diese Weise ermittelten Daten zusammengestellt.

a bedeutet darin die Anfangskonzentration, c die Gleichgewichtskonzentration des Absorbendums und x die gebundene Menge Tannin. Auf welche Weise der für x „berechnete" Wert gefunden wurde, soll später angegeben werden.

Tabelle zu Versuchsreihe A von S. 474.[1])

Leimkonzentration: 0,05%. $\beta = 0{,}1000$. $\frac{1}{p} = 0{,}2493$.

Versuch	a in %	c in %	x beob. in g	x ber. in g
1	0,05	0,0018	0,0289	0,0229
2	0,10	0,0227	0,0464	0,0417
3	0,15	0,0670	0,0498	0,0525
4	0,20	0,1043	0,0574	0,0589
5	0,25	0,1477	0,0614	0,0646
6	0,30	0,1967	0,0620	0,0676
7	0,35	0,2405	0,0657	0,0708
8 (10)	0,50	0,3833	0,0700	0,0794
9 (11)	0,55	0,4218	0,0769	0,0813
10 (12)	0,60	0,4695	0,0783	0,0832
11 (13)	0,75	0,6005	0,0868	0,0891

[1]) Versuch 8 und 9 sind von der Tabelle S. 474 nicht mit übernommen worden, da sie sicher falsche Resultate aufweisen und hier das Gesamtergebnis ungünstig beeinflussen würden. Soweit die Versuchsnummern nicht mehr übereinstimmen, sind die alten Nummern in Parenthese beigefügt.

Tabelle zu Versuchsreihe B von S. 474.

Leimkonzentration: 0,05%. $\beta = 0{,}0794$. $\frac{1}{p} = 0{,}1228$.

Versuch	a in %	c in %	x beob. in g	x ber. in g
1	0,05	0,0018	0,0289	0,0389
2	0,25	0,1470	0,0618	0,0645
3	0,60	0,4650	0,0810	0,0741
4	0,75	0,6100	0,0840	0,0759
5	0,80	0,6621	0,0827	0,0759
6	1,00	0,8575	0,0855	0,0776

Tabelle zu Versuchsreihe C von S. 475.

Leimkonzentration: 0,125%. $\beta = 0{,}1288$. $\frac{1}{p} = 0{,}3249$.

Versuch	a in %	c in %	x beob. in g	x ber. in g
1	0,125	0,0095	0,0462	0,0302
2	0,250	0,0830	0,0668	0,0589
3	0,500	0,2795	0,0882	0,0871
4	0,750	0,5010	0,0996	0,1023
5	1,000	0,7270	0,1092	0,1148
6	1,250	0,9700	0,1120	0,1259
7	1,500	1,1890	0,1244	0,1349
8	1,750	1,4310	0,1276	0,1413
9	1,875	1,5525	0,1290	0,1445
10	2,000	1,6485	0,1406	0,1479
11	2,250	1,8890	0,1444	0,1549
12	2,500	2,1050	0,1580	0,1622
13	3,125	2,7060	0,1676	0,1738

Tabelle zu Versuchsreihe D von S. 476.

Leimkonzentration: 0,1930%. $\beta = 0{,}0955$. $\frac{1}{p} = 0{,}2126$.

Versuch	a in %	c in %	x beob. in g	x ber. in g
1	0,1640	0,0040	0,0320	0,0309
2	0,1875	0,0100	0,0355	0,0372
3	0,2345	0,0150	0,0439	0,0407
4	0,3520	0,0800	0,0544	0,0569
5	0,4690	0,1470	0,0644	0,0644
6	0,5865	0,2550	0,0663	0,0724
7	1,1725	0,7000	0,0945	0,0891
8	2,3450	1,8400	0,1010	0,1070

Tabelle zu Versuchsreihe G von S. 477.

Leimkonzentration: 0,05%. $\beta = 0{,}0902$. $\frac{1}{p} = 0{,}3153$.

Versuch	a in %	c in %	x beob. in g	x ber. in g
1	0,25	0,1537	0,0578	0,0513
2	0,50	0,3987	0,0608	0,0676
3	0,75	0,6177	0,0794	0,0776

Zur Erläuterung dieser Tabellen ist zu bemerken: die oben angeführte Exponentialfunktion

$$\frac{x}{m} = \beta \cdot c^{\frac{1}{p}}$$

ergibt durch Logarithmieren (unter Weglassung von m):

$$\log x = \log \beta + \frac{1}{p} \log c.$$

Dies bedeutet die Gleichung einer Geraden, die auf der log x-Achse das Stück log β abschneidet und mit der log c-Achse den Winkel tang $\frac{1}{p}$ bildet.

Um aus den Versuchsdaten die Gerade zu konstruieren, trägt man zunächst in ein rechtwinkliges Koordinatensystem die Logarithmen (es wurden dekadische Logarithmen verwendet) der c- und x-Werte ein.

Aus diesen experimentell ermittelten Punkten konstruiert man weiter die ausgeglichene Gerade in der von Freundlich[1]) angegebenen Weise.

Die Strecke zwischen dem Schnittpunkt dieser Geraden mit der x-Achse und dem Nullpunkt ergibt unmittelbar den Wert für log β, während man die „berechneten" x-Werte durch graphische Interpolation erhält.

Die den fünf obigen Tabellen entsprechenden Kurven mögen hier folgen, die Fig. 10 bis 14 veranschaulichen die Beziehung zwischen x und c und die Fig. 15 und 16 die Beziehung zwischen log x und log c.

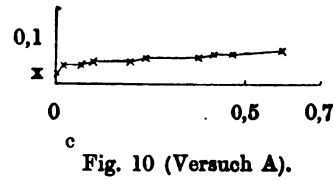


Fig. 10 (Versuch A).

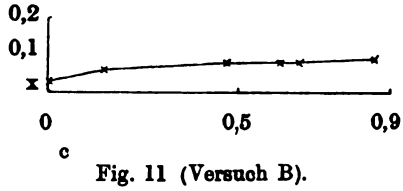


Fig. 11 (Versuch B).

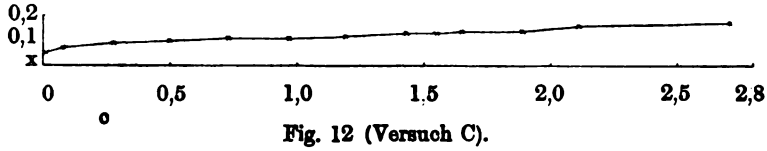


Fig. 12 (Versuch C).

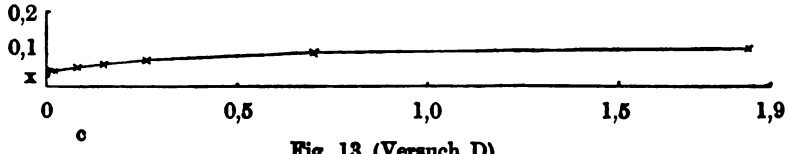


Fig. 13 (Versuch D).

[1]) Freundlich, Über die Adsorption in Lösungen. Habilitationsschrift, Leipzig 1906, S. 11.

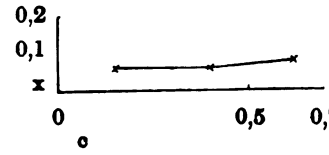


Fig. 14 (Versuch G).

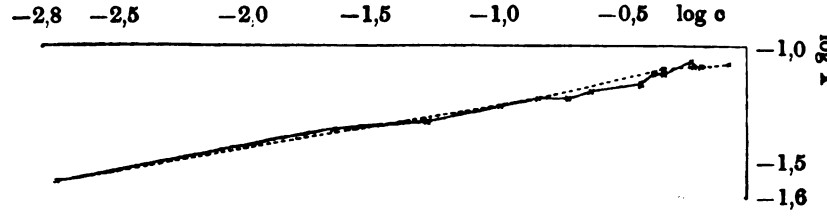


Fig. 15 (Versuche A und B).

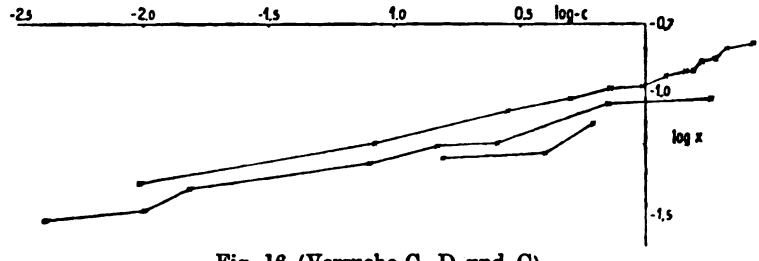


Fig. 16 (Versuche C, D und G).

Wie ersichtlich haben die Kurven der logarithmischen Werte in der Tat annähernd die Gestalt von Geraden, wenngleich die Abweichungen größer sind als bei den Versuchen, die von anderer Seite mit Kohle oder einem anderen festen Adsorbens angestellt worden sind und eine viel größere experimentelle Genauigkeit ermöglichten.

Diese Abweichungen kommen auch in den obigen fünf Tabellen zwischen den beobachteten und berechneten Werten für x recht merklich zum Ausdruck. Berücksichtigt man jedoch die zahlreichen Fehlerquellen, mit denen aus oben erörterten Gründen diese Versuche behaftet sind, so werden diese Differenzen verständlich, so daß also diese Versuche bezüglich der Gültigkeit der Adsorptionsformel als beweisend angesehen werden dürfen.

Dafür sprechen auch einige andere Umstände.

Freundlich[1]) fand, daß die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung (z. B. im System Blutkohle — wässerige Essigsäurelösung) außerordentlich groß ist und daß der Temperaturkoeffizient als sehr gering angesehen werden kann. Beides trifft auch für das vorliegend studierte System Leim — Tannin (in wässeriger Lösung) zu, wie aus den Versuchsdaten im Abschnitt 1 zur Genüge hervorgeht.

Des weiteren hat Freundlich[2]) gefunden, daß die Konzentration in der Lösung (c) und die Konzentration an der Oberfläche des Adsorbens (x) nicht proportional sind, daß vielmehr die Änderungen von x nur klein, die von c hingegen sehr groß sind. D. h. mit anderen Worten, daß aus verdünnten Lösungen relativ viel, aus konzentrierten relativ wenig adsorbiert wird. Dies Verhalten, das man als typisch für die Adsorption bezeichnet hat, zeigte sich deutlich auch bei den vorliegenden Versuchen. Dies lehrt ein Einblick in die obigen 5 Tabellen sowie die Betrachtung der Kurven in Fig. 10 bis 14, die das Verhältnis von x : c (den Adsorptionskoeffizienten) wiedergeben.

In den logarithmischen Diagrammen äußert sich diese Erscheinung dadurch, daß die Ordinaten (log x) nur wenig, die Abszissen (log c) hingegen in beträchtlich größerem Maße variieren.

Des weiteren sei noch auf einen Umstand hingewiesen, der gleichfalls die Bindung des Tannins durch den Leim als eine Adsorptionserscheinung dokumentiert.

Es ist bekannt,[3]) daß die Adsorption in organischen Lösungsmitteln sehr viel geringer ist als in Wasser, welchen Umstand man dazu benutzen kann, um adsorbierte Stoffe wieder von der Oberfläche eines Adsorbens zu entfernen. So läßt sich z. B. eine Kristallviolettlösung durch Kohle völlig entfärben, gießt man dann das Wasser ab und gibt Alkohol zu, so färbt sich dieser sofort tiefviolett.

Oben ist nun schon einmal darauf hingewiesen worden, daß selbst das wasserbeständige Leimtannat durch Alkohol rasch zerlegt wird, indem es an diesen Tannin abgibt.

Dies wasserbeständige Leimtannat hätte noch am ehesten Anspruch gehabt, als chemische Verbindung zu gelten; wie aus dem eben Gesagten hervorgeht, besteht jedoch eine so weitgehende Analogie mit den an anderen Stoffen studierten Adsorptionserscheinungen, daß das Vorliegen einer wirklichen chemischen Verbindung als ausgeschlossen betrachtet werden darf.

---

[1]) Freundlich, Über die Adsorption in Lösungen. Habilitationsschrift, Leipzig 1906, S. 8 und 43.

[2]) Ibid. S. 93.

[3]) Freundlich, Kapillarchemie. Leipzig 1909. S. 161.

Aber auch noch aus einem anderen Grunde spricht diese Zerlegung des Leimtannates durch Alkohol für eine Adsorptionserscheinung. Wie im 2. Abschnitt angedeutet wurde, ist die Geschwindigkeit der Tanninabgabe anfangs sehr beträchtlich, während sie später asymptotisch abnimmt, ohne daß es möglich wäre, dem Leimtannat die letzten Spuren Tannin zu entziehen.

Das ist aber das gleiche Verhalten, das man schon an anderen Adsorptionsvorgängen beobachtet hat.[1])

Zuletzt sei noch darauf hingewiesen, daß auch die für $\frac{1}{p}$ gefundenen Werte von der Größenordnung sind, die nach den bisherigen Untersuchungen diesem Exponenten zukommt. Es hat sich gezeigt,[2]) daß die Werte für $\frac{1}{p}$ zwischen 0,1 und 0,5 liegen, was im vorliegenden Falle in der Tat auch stattfindet.

Untereinander stimmen die für $\frac{1}{p}$ ermittelten Werte allerdings nur zum Teil überein, während man vielleicht einen konstanten Wert hätte erwarten können.

Denn aus den Untersuchungen von Freundlich[3]) und anderen hat sich ergeben, daß jedem Stoff ein bestimmter Wert für $\frac{1}{p}$ zukommt. Die obigen 5 Versuchsreihen zeigen jedoch, daß $\frac{1}{p}$ von der Versuchsanordnung (Anzahl der beobachteten Punkte, Wahl der Anfangskonzentration des Adsorbendums) abhängig ist.

Somit finden sich im wesentlichen alle allgemeingültigen Gesetzmäßigkeiten der Adsorption an der Reaktion von Tannin auf Leim bestätigt, so daß der älteren Annahme einer rein „chemischen" Reaktion zwischen den beiden Kolloiden kein Anspruch auf Berechtigung mehr zuerkannt werden kann.

Die erhaltenen Resultate können daher hier nochmals dahin zusammengefaßt werden, daß die Fällung des Leims durch Tannin den Adsorptionserscheinungen zuzurechnen ist und daß die dabei auftretenden „chemischen" Reaktionen untergeordneter Art, bei dem Charakter der beteiligten Stoffe aber recht wohl verständlich sind.

---

[1]) W. Ostwald, Grundriß der Kolloidchemie. Dresden 1909. S. 413.

[2]) Freundlich, Kapillarchemie. Leipzig 1909. S. 149.

[3]) Ibid. S. 150.

Über das optische Drehungsvermögen des Leims.

Von

Hans Trunkel.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 9. Mai 1910.)

Mit 7 Figuren im Text.

Die Linksdrehung des Leims ist bisher wenig untersucht worden, es finden sich, soweit mir bekannt, in der Literatur nur drei darauf bezügliche Arbeiten.

De Bary[1]) untersuchte die Drehung von Gelatine und Hausenblase und gibt für die Abhängigkeit der Drehung von der Temperatur folgende Zahlen an:

Gramm Substanz in 100 ccm	Spezifische Drehung Grad	Temperatur Grad
6,12	— 123,0	35—40
6,12	— 130,0	24—25
3,06	— 125,0	35
3,06	— 130,5	24—25
1,53	— 130,5	30

Die zwei weiteren Arbeiten sind Untersuchungen über das Drehungsvermögen des β-Leims.

Krüger[2]) gab als Novum für den β-Leim an, daß beim Übergang von α-Leim in β-Leim die spezifische Drehung beträchtlich heruntergeht, von — 167,5° auf — 136°.

Framm[3]) untersuchte den Einfluß der Konzentration am β-Leim und gibt folgende Zahlen an:

Konzentration:	5%	4%	3%	2%	1%
Spezifische Drehung:	— 120,7°	— 118,1°	— 117,5°	— 114,0°	— 113,7°

[1]) Hoppe-Seylers Medizinisch-chemische Untersuchungen 1, 71, 1866.

[2]) Malys Jahresberichte über die Fortschritte der Tierchemie 1889, 29.

[3]) Arch. f. d. ges. Physiol. 68, 144, 1897.

Wie später gezeigt werden wird, sind alle diese Resultate nicht einwandfrei. Die Drehung des Leims ist in komplizierter Weise abhängig von mehreren Faktoren, eine exakte Untersuchung des Drehungsvermögens ist nur unter Einhaltung besonderer Vorsichtsmaßregeln möglich.

Vor Wiedergabe der diesseits erhaltenen Resultate mögen aus diesem Grunde einige Bemerkungen über die notwendigen Vorbedingungen und über die Art der Ausführung dieser Untersuchungen Platz finden.

Da trübe Leimlösungen zur Polarisation nicht brauchbar sind, wurden klare Lösungen auf folgende Weise hergestellt.

Der Leim wurde nach gutem Quellen mit der erforderlichen Menge Wasser 6—8^h einer Temperatur von 80° ausgesetzt, die Lösung durch doppeltes, glattes, gehärtetes Filter filtriert und in völlig gefüllten, sterilisierten Glasstöpselflaschen aufbewahrt, die mit Lauge und Säure behandelt und in bekannter Weise gedämpft worden waren.

So bereitete Lösungen zeigten höchstens im auffallenden Lichte minimale Opalescenz.

Bei Lösungen von ungefähr 1% Leimgehalt ab ist der Erfolg unsicher, und damit hängt es einerseits zusammen, daß sich exakte Untersuchungen nur mit Lösungen bis zu ungefähr 0,8% Leimgehalt ausführen ließen. Andrerseits bedingt bei Lösungen von höherer Konzentration die Eigenfarbe des Leims eine Gelbfärbung, die eine optische Messung von der erforderlichen Genauigkeit ausschließt.

Erhitzt man die Lösungen vor der Beobachtung höher und länger, oder wählt die Beobachtungstemperatur höher als 15°, so liegen die Verhältnisse etwas günstiger.

Wie später gezeigt werden wird, bedingt längeres vorheriges Erwärmen (auch schon 6 bis 8stündiges Erwärmen) eine dauernde Herabsetzung der Linksdrehung, dies ist bei allen auf obige Weise bereiteten Lösungen zu berücksichtigen.

Da jedoch nur kurze Zeit erwärmte Leimlösungen zufolge alsbald eintretender Undurchsichtigkeit jede Beobachtung ausschließen, mußten die meisten Lösungen in obiger Weise hergestellt werden.

Der Gehalt der Leimlösungen ist für bei 100° getrocknete Substanz angegeben. Das spezifische Gewicht wurde mittels

Pyknometers bei der Beobachtungstemperatur, falls diese variabel, bei 15° bestimmt.

Im letzteren Falle erfolgte die Berechnung der spezifischen Drehung für alle Temperaturen unter Zugrundelegung des für 15° ermittelten spezifischen Gewichtes, unter Vernachlässigung des dadurch bedingten kleinen Fehlers.

Um alle Beobachtungen untereinander vergleichen zu können, wurden alle Untersuchungen mit dem gleichen Material ausgeführt. Alle Messungen sind mit einem modernen Polarisationsapparat von Schmidt und Hänsch (Berlin) bei Natriumlicht und unter Verwendung eines Kaliumbichromatfilters ausgeführt.

Fast alle Drehungswerte sind als Mittel aus 6 Einzelablesungen angegeben.

Die meisten Beobachtungen sind mit einem Rohr von folgender Einrichtung ausgeführt.

Um ein innen auf galvanischem Wege vergoldetes Metallrohr vom für Polarisationsröhren üblichen Durchmesser und 200 mm Länge ist nach Art des Liebigschen Kühlers ein Metallmantel gelegt mit Zu- und Abflußrohr für das Wasser.

In der Mitte ist senkrecht zur Längsachse ein Rohr eingelassen, das durch den Kühler hindurch bis zum inneren, zur Aufnahme der Flüssigkeit bestimmten Rohre reicht, so daß das Thermometer dauernd mit der Untersuchungsflüssigkeit in Berührung bleiben kann.

Indem man das Thermometer mit einem einfach durchbohrten Kautschukstopfen auf die lotrechte Röhre aufpaßt, erreicht man den im Interesse der Haltbarkeit der Lösungen erwünschten hermetischen Verschluß.

Da die Erwärmung oder Kühlung mit Wasser ständige Beobachtung verlangt, wurde nur mit Wasser gekühlt, das Erwärmen hingegen auf elektrischem Wege ausgeführt.

Zu diesem Zwecke ist über dem Mantel des Rohres eine isolierte Wickelung von Konstantanwiderstandsdraht angebracht, die in zwei Klemmschrauben ausläuft, die mit der Starkstromleitung verbunden werden.

Durch Einschalten eines regulierbaren Vorschaltwiderstandes kann bei selbsttätiger Regulierung durch ein in die lotrechte Röhre eingesetztes Kontaktthermometer jede Temperatur konstant erhalten werden. Bedingung ist nur, daß diese Temperatur über der Zimmertemperatur liegt. Die Kontrolle erfolgt durch jedesmalige Ablesung der Temperatur.

Magnetische Polarisation konnte, wie Versuche mit optisch inaktiven Flüssigkeiten zeigten, nicht beobachtet werden, was bei der kurzen einmaligen Wickelung durchaus zu erwarten stand.

Umstehende Abbildung (Fig. 1) veranschaulicht dieses, für den vorliegenden Zweck eigens im Institut hergestellte Beobachtungsrohr, der besseren Sichtbarkeit wegen auf einem kleinen Polarisationsapparat. —

Der bisherige Stand unserer Kenntnis ist kurz dahin zusammenzufassen, daß die spezifische Drehung mit der Temperatur variabel ist und daß anhaltend auf 100° erhitzter Leim (β-Leim) ein geringeres Drehungsvermögen besitzt als gewöhnlicher α-Leim.

Es stellte sich bei der Untersuchung sehr bald heraus, daß die Verhältnisse der optischen Aktivität von Leimlösungen ziemlich verwickelte sind.

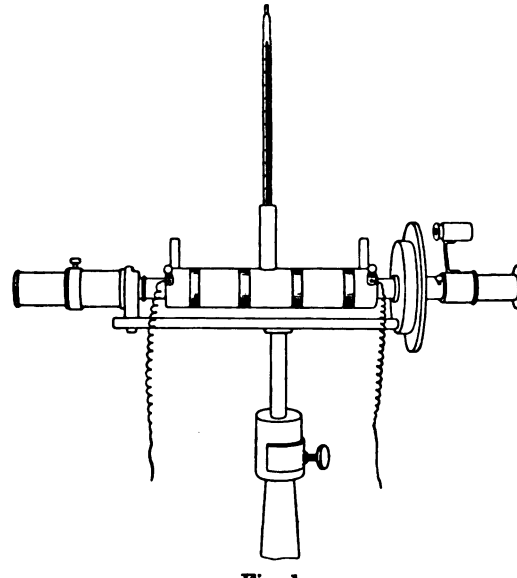


Fig. 1.

Um das umfangreiche Material meiner Beobachtungen dem Leser in seinen Resultaten übersichtlich darzustellen, will ich die wesentlichen Punkte im einzelnen besprechen und dabei auf die im Anhang zusammengestellten Versuchsprotokolle als Belege hinweisen.

1. Die optische Aktivität einer Leimlösung ist (mit der unter Punkt 2) angeführten Ausnahme) bei konstanter Beobachtungstemperatur mit der Zeit veränderlich, in dem Sinne, daß eine in der Wärme frisch hergestellte Lösung, nachdem sie sich auf die Temperatur von 10 bis 15° C abgekühlt hat, bei der betreffenden Temperatur nicht etwa sofort eine konstante Drehung aufweist, sondern eine (von den unten näher zu bezeichnenden Umständen abhängende) verschieden lange Zeit braucht, ehe mit dem Maximum der Drehung Konstanz erreicht ist.

Die Zeitwerte für den Eintritt des Drehungsmaximums variieren in den Grenzen von 12 bis 120^h (vgl. Spalte 5 nachfolgender Zusammenstellung), die Zunahme der Ablenkung kann etwas mehr betragen als die zu Beginn beobachtete, so daß die konstante maximale Drehung das Doppelte der anfänglichen überschreitet. Das $2^1/_2$fache der ursprünglichen Ablenkung erreichte die maximale Drehung in keinem Falle, wie aus Spalte 6 und 7 nachfolgender Zusammenstellung ersichtlich ist.

1. Protokoll-Nr.	2. Konzentration %	3. Vorheriges Erwärmen Dauer	3. Vorheriges Erwärmen Höhe Grad	4. Beobachtungstemperatur Grad	5. Nach wieviel Stunden ist die konstante maximale Drehung erreicht?	6. Anfangswert a und Maximalwert b	7. Zunahme der Drehung (b—a)	8. Quotient $\frac{b}{a}$
						a b		
1a	0,57	9^h 30′	80	15	69^h	153—248	95	1,62
b	0,29				41^h	136—234	98	1,72
2a	0,55	7^h 30′	80	15	44^h	139—259	120	1,86
b	0,27				65^h 30′	148—257	109	1,74
3a	0,53	7^h 30′	80	15	41^h 30′	124—256	132	2,07
b	0,28				41^h 30′	111—239	128	2,15
4a	0,47	7^h 30′	80	15	47^h 30′	122—251	129	2,06
b	0,24				47^h 30′	102—217	115	2,13
5	0,40	5′	60	15	12^h	202—303	101	1,50
6	0,42	8^h 20′	80	15	94^h 45′	105—246	141	2,34
7a	0,45	7^h 30′	80	20	71^h 30′	144—229	85	1,59
b	0,22				89^h 30′	123—202	79	1,64
8a	0,48	7^h 30′	80	20	74^h	144—210	66	1,46
b	0,25				71^h 30′	128—196	68	1,53
9	0,76	7^h 30′	80	20	66^h	141—243	102	1,72
10a	0,47	7^h 30′	80	25	113^h 30′	112—162	50	1,45
b	0,23				119^h 30′	102—150	48	1,47
11a	0,48	7^h 30′	80	25	113^h 30′	131—158	27	1,21
b	0,24				65^h 30′	121—142	21	1,17
12	0,90	7^h 30′	80	25	90^h	157—191	34	1,22
13a	0,43	7^h 30′	80	25	113^h 30′	130—173	43	1,33
b	0,45	5′	80	25	65^h 30′	140—202	62	1,44

Die Zeitwerte für den Eintritt der maximalen Ablenkung sind einerseits um so kleiner, je niedriger die Beobachtungstemperatur ist, andrerseits um so größer, je länger und höher die Lösung vor der Beobachtung erwärmt wurde.

Zu der ersten Beziehung wolle man die vorstehende Tabelle vergleichen. In ihr sind die Versuchsprotokolle nach steigender Beobachtungstemperatur geordnet. Berechnet man aus allen für eine Temperatur angeführten Zeitwerten das Mittel, so ergibt sich, daß bei den Beobachtungstemperaturen 15°, 20° und 25° der Zeitwert 50^h 30′, 74^h 30′ und 97^h 30′ beträgt. Es stehen also die Beobachtungstemperaturen im Verhältnis von 3:4:5, die Zeitwerte annähernd im Verhältnis von 2:3:4.

Die zweite der obigen Beziehungen sei durch einige Beispiele erläutert.

Eine 8^h 20′ auf 80° erwärmte Leimlösung (Protokoll 6) erreichte die maximale Ablenkung nach 94^h 45′, eine 5′ auf 60° erwärmte Lösung hingegen schon nach 12^h (Protokoll 5).

Von zwei anderen Lösungen wurde die eine 7^h 30′, die andere nur 5′ auf 80° erwärmt. Die zugehörigen Zeitwerte sind 113^h 30′ und 65^h 30′. (Protokoll 13a und b.)

2. Wird die Untersuchung bei der konstanten Temperatur von 30° vorgenommen, so erhält man schon von Anfang an annähernd konstante Ablenkungen.

Man wolle hierzu die Protokolle 14 bis 17 sowie die Fig. 3 und 7 vergleichen.

3. Die Höhe des erreichbaren Maximums der Linksdrehung, bei dem unter den sub 1 und 2 angeführten Bedingungen Konstanz eintritt, ist abhängig:

a) von der Länge der Zeit, während der die untersuchte Leimlösung vor der Beobachtung erhitzt wurde und von der Höhe der dabei angewandten Temperatur,

b) von der Beobachtungstemperatur,

c) von der Konzentration der Leimlösungen,

d) von unbekannten Eigenschaften des Leims.

ad a: Eine 5′ auf 60° erwärmte Leimlösung (Protokoll 5) erreichte eine maximale Ablenkung von 303°, eine 8^h 20′ auf 80° erwärmte Lösung dagegen eine maximale Drehung von nur 246° (Protokoll 6).

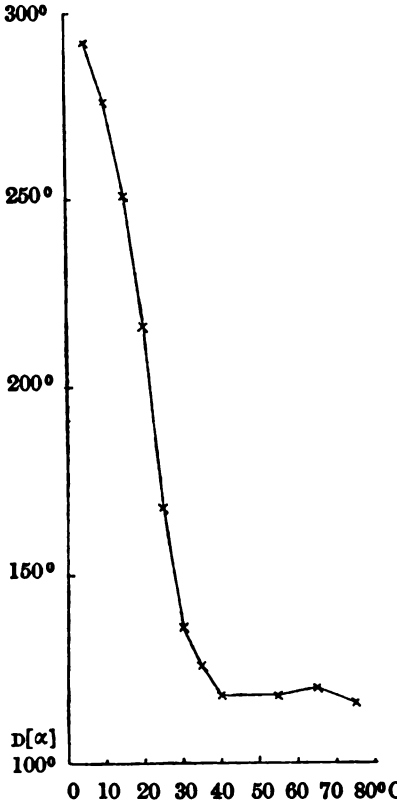


Fig. 2 (zu der Tabelle von S. 499 bis 500). Abhängigkeit des Drehungsmaximums von der Temperatur.

Ferner betrug das Drehungsmaximum einer nur 5′ auf 80° erwärmten Leimlösung 202°, das einer 7^h 30′ auf 80° erwärmten Lösung aber nur 173°. (Protokoll 13a u. b.)

ad b: Je niedriger die Beobachtungstemperatur ist, um so höhere Werte erreicht das Maximum. Man wolle dazu die Fig. 2 und 3 vergleichen.

Die Bedeutung der Fig. 3 ist ohne weiteres zu erkennen, während zu Fig. 2 zu bemerken ist, daß sie auf Grund nebenstehender Tabelle,

in die die absolut höchste Drehung jeder Versuchsreihe für die einzelnen Beobachtungstemperaturen eingetragen ist, angefertigt wurde. Zur Vergleichung mit den zugehörigen Protokollen ist in dieser Tabelle jedem Wert die Protokollnummer in Parenthese vorangesetzt.

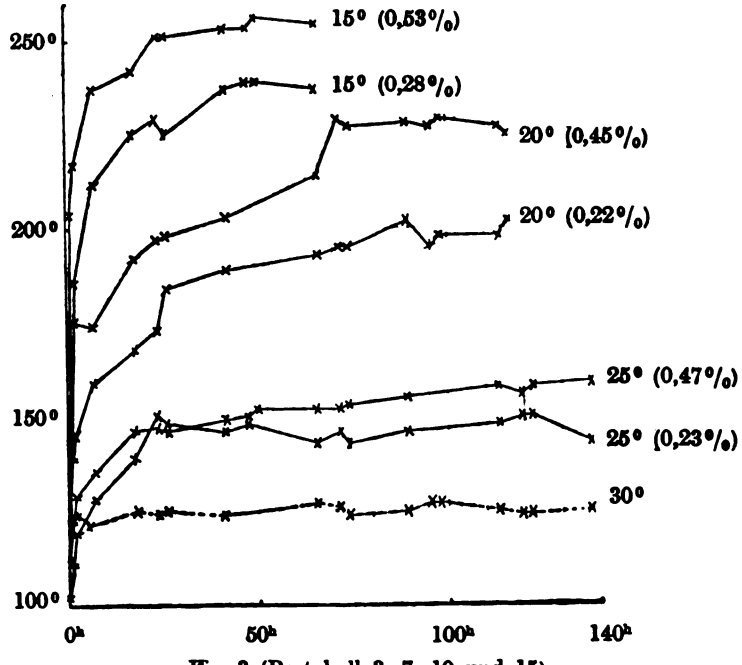


Fig. 3 (Protokoll 3, 7, 10 und 15).
Abhängigkeit der Drehung von der Beobachtungstemperatur, Konzentration und Zeit.

Tabelle zu Fig. 2.

5°	10°	15°	20°	25°	30°
(22) 299	(22) 278	(1) 248	(7) 229	(13) 173	(14) 131
(21) 294	(21) 274	(1) 234	(7) 202	(13) 202	(14) 135
		(2) 259	(8) 210	(10) 162	(15) 127
		(2) 257	(8) 196	(10) 150	(16) 143
		(3) 256	(9) 243	(11) 158	(17) 146
		(3) 239		(11) 142	
		(4) 251		(12) 191	
		(4) 217			
		(5) 303			
		(6) 246			
292°	276°	251°	216°	168°	136°

35°	40°	55°	65°	75°
(18) 100 (19) 133 (20) 145	(18) 97 (19) 128 (20) 128	(18) 106 (19) 125 (20) 123	(18) 102 (19) 127 (20) 130	(18) 100 (20) 131
126°	118°	118°	120°	116°

ad c: Von der Konzentration der Leimlösungen hängt das Drehungsmaximum insofern ab, als konzentriertere Lösungen fast ausnahmslos ein höheres Maximum erreichen als weniger konzentrierte.

Die Versuche konnten in diesem Punkte wegen der Grenzen der Durchsichtigkeit (vgl. oben) nicht in der gewünschten Ausdehnung variiert werden.

Wurden jedoch zwei an sich wenig konzentrierte Leimlösungen nebeneinander beobachtet, von denen die eine annähernd die halbe Konzentration der anderen besaß, so zeigte die weniger konzentrierte Lösung ein niedrigeres Maximum. (Die einzige Ausnahme machen die Lösungen von Protokoll 14.)

Bei 20°, 25° und 30° als Beobachtungstemperatur konnten einige Lösungen von höherer Konzentration für sich untersucht werden, die Ergebnisse bestätigten den besagten Einfluß der Konzentration.

Man vergleiche zu vorstehendem die Fig. 3, 4, 5 und 6 sowie folgende Zahlenwerte:

Beobachtungstemperatur 15°	Konzentration: %	Maximum: Grad
Protokoll 1 (a und b)	0,57	248
	0,29	234
Protokoll 2 (a und b)	0,55	259
	0,27	257
Protokoll 3 (a und b)	0,53	256
	0,28	239
Protokoll 4 (a und b)	0,47	251
	0,24	217

Beobachtungstemperatur 20°	Konzentration: %	Maximum: Grad
Protokoll 7 (a und b)	0,45	229
	0,22	202
Protokoll 8 (a und b)	0,48	210
	0,25	196
Protokoll 9	0,76	243

Beobachtungstemperatur 25°	Konzentration: %	Maximum: Grad
Protokoll 10 (a und b)	0,47	162
	0,23	150
Protokoll 11 (a und b)	0,48	158
	0,24	142
Protokoll 12	0,90	191

Beobachtungstemperatur 30°	Konzentration: %	Maximum: Grad
Protokoll 15	0,48	127
Protokoll 16	0,79	143
Protokoll 17	1,49	146

add: Unbekannte Eigenschaften des Leims beeinflussen das Drehungsmaximum insofern, als verschiedene Präparate gereinigten Leims, ja selbst aus einem und demselben Präparate hergestellte Lösungen niemals innerhalb der Fehlergrenze identische Drehungsmaxima aufweisen. Z. B. erreichten zwei unter analogen Bedingungen (nur die Konzentrationen differieren um 0,01 %) beobachtete Lösungen (Protokoll 2b und 3b) das Drehungsmaximum bei 257° resp. 239°, so daß sich eine Differenz von 18° ergibt, für die die Versuchsbedingungen keine Erklärung zulassen.

4. Das erreichbare Minimum der Linksdrehung ist abhängig von der Beobachtungstemperatur und stellt sich annähernd schon bei 30 bis 35° C ein; höhere Temperaturen (bis 80°) bewirken keine wesentliche Abnahme der Drehung mehr.

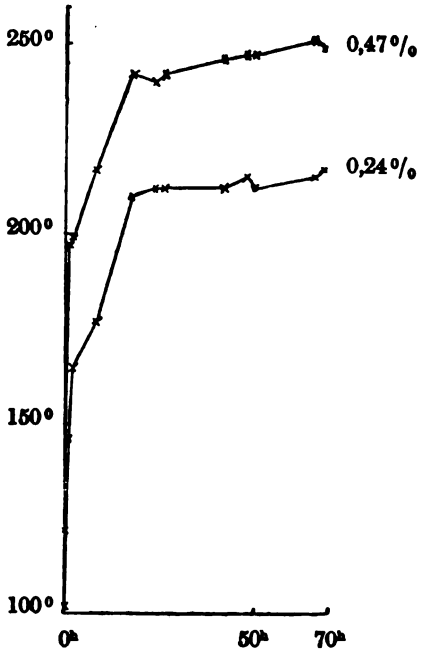


Fig. 4 (Protokoll 4). Einfluß der Zeit und Konzentration bei der konstanten Beobachtungstemperatur von 15°.

Z. B. betrug in einem Falle (Protokoll 18) die Ablenkung sowohl bei 35° als auch bei 75° C 99,9°, in einem anderen Falle (Protokoll 19) ist die Drehung bei 35° C nur um 5° höher als bei 80° C. (133,3° und 128,3°.)

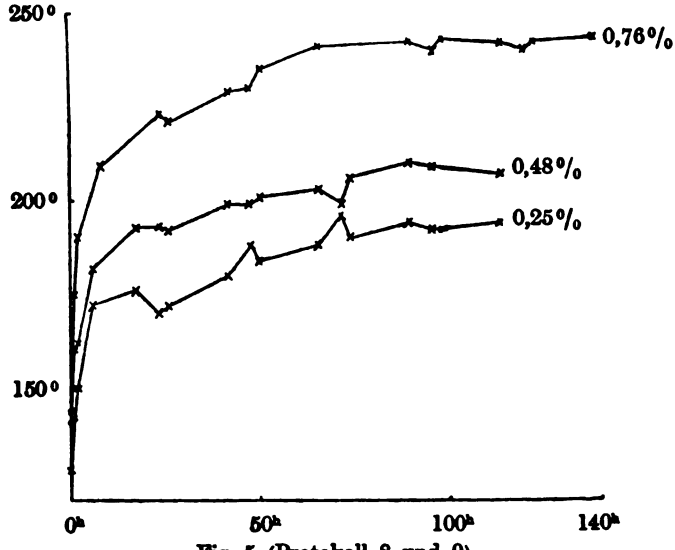


Fig. 5 (Protokoll 8 und 9).
Einfluß der Zeit und Konzentration bei der konstanten Beobachtungstemperatur von 20°.

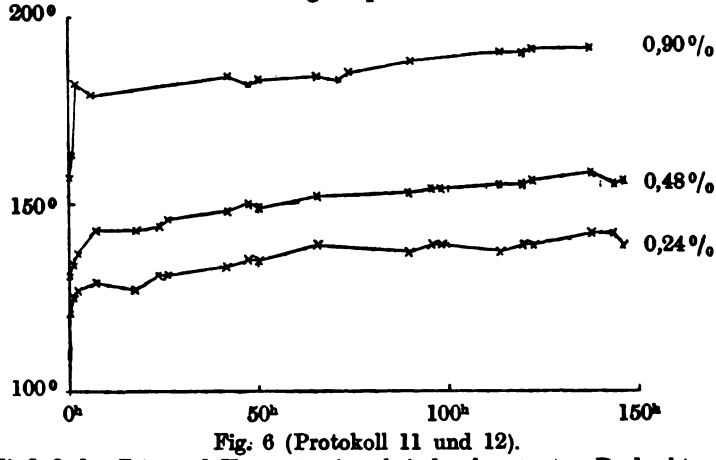


Fig. 6 (Protokoll 11 und 12).
Einfluß der Zeit und Konzentration bei der konstanten Beobachtungstemperatur von 25°.

Des weiteren verminderte sich die Drehung einer Leimlösung (Protokoll 20) beim Erwärmen von 18° auf 35° C um 107°, während eine weitere Steigerung der Temperatur um 40° C die Ablenkung nur noch um 13° herabsetzte.

5. Die Änderungen der Ablenkung bei steigender oder fallender Temperatur sind umkehrbar, vorausgesetzt, daß keine länger dauernde Erhitzung auf höhere Temperaturen dabei stattfindet.

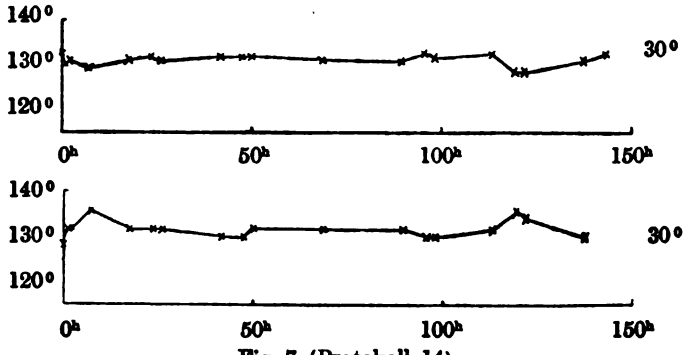


Fig. 7 (Protokoll 14).
Abhängigkeit der Drehung von der Zeit bei der konstanten Beobachtungstemperatur von 15°.

6. Verhalten des β-Leims.

Bekanntlich bezeichnet man Leim, der durch anhaltendes Erhitzen das Gelatinierungsvermögen eingebüßt hat, nach Traubes[1]) Vorgang als β-Leim.

Zur Untersuchung des optischen Verhaltens dieses β-Leims habe ich mir verschiedene derartige Präparate in der Weise hergestellt, daß ich die Lösungen in zugeschmolzenen Bombenröhren längere Zeit im siedenden Wasser erhitzte.

Bezüglich des Drehungsvermögens dieser β-Leimlösungen ist folgendes zu bemerken:

a) Allgemein läßt sich aussagen, daß die Linksdrehung des β-Leims geringer ist als die des α-Leims. Die maximale Ablenkung der untersuchten β-Leimlösungen war in allen Fällen geringer als 200°.

b) Im Gegensatz zum α-Leim ist die Ablenkung des β-Leims mit der Zeit nicht oder fast nicht veränderlich, vielmehr von Anfang an annähernd konstant. (Protokoll 26 bis 29.)

c) Die Höhe des erreichbaren Drehungsmaximums ist erstens abhängig von der Dauer des vorherigen Erhitzens auf 100° und zweitens von der Beobachtungstemperatur, hingegen nicht von der Konzentration.

Zu der ersten Beziehung wolle man die Protokolle 26, 27 und 28 vergleichen; die Lösungen wurden 20h, 64h und 228h auf 100° erhitzt und erreichten das Drehungsmaximum bei 164°, 143° und 137°.

Je länger vor der Beobachtung erhitzt wurde, um so niedriger ist also das Ablenkungsmaximum.

Zu der zweiten Beziehung sei bemerkt, daß die maximale Ablenkung einer β-Leimlösung, die bei 20° C konstant beobachtet wurde (Protokoll 29), nur 128° betrug, also geringer ist als die der drei obengenannten Lösungen, die bei der Temperatur von 15° zur Beobachtung gelangten.

[1]) Traube, Gesammelte Abhandlungen, Berlin 1899, S. 221.

d) Das erreichbare Minimum der Linksdrehung des β-Leims ist abhängig von der Beobachtungstemperatur, stellt sich jedoch nicht, wie beim α-Leim, schon bei 30 bis 35° C. sondern erst allmählich beim Erhitzen auf höhere Temperaturen ein. (Protokoll 29.)

Protokoll 1 (a und b).[1])

$c_a = 0{,}57\,\%$ und $c_b = 0{,}29\,\%$.
Spez. Gewicht 1,0008 und 1,0004.
Vorheriges Erwärmen: 9^h 30′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 15° konstant.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung: c_a	Spezifische Drehung: c_b
8.3.09	6^h p.m.	18°, 20°	—153,4°	—136,2°
	6^h 30′ p.m.	15°	—179,7°	—167,2°
	7^h p.m.	15°	—199,0°	—168,9°
9.3.09	12^h 15′ a.m.	15°	—232,3°	—198,2°
	9^h 30′ a.m.	15°	—235,8°	—229,2°
	3^h p.m.	15°	—237,5°	—229,2°
	6^h 30′ p.m.	15°	—239,3°	—224,0°
10.3.09	11^h a.m.	15°	— —	—230,9°
11.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	— —	—234,4°
	3^h p.m.	15°	—247,2°	—232,7°
	6^h 30′ p.m.	15°	—248,1°	—232,7°
12.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	—246,3°	—232,7°
	12^h m.	15°	—248,1°	—232,7°

Protokoll 2 (a und b).

$c_a = 0{,}55\,\%$ und $c_b = 0{,}27\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0008 und 1,0004.
Vorheriges Erwärmen: 7^h 30′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 15° konstant.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung: c_a	Spezifische Drehung: c_b
12.3.09	4^h p.m.	25°, 25°	—139,0°	—148,1°
	5^h p.m.	15°	—198,0°	—207,3°
	6^h p.m.	15°	—213,5°	—222,1°
	11^h 45′ p.m.	15°	—239,8°	—227,7°
13.3.09	9^h a.m.	15°	—240,7°	—229,5°
	3^h 30′ p.m.	15°	—248,9°	—231,4°
	6^h 30′ p.m.	15°	—250,7°	—238,8°
14.3.09	12^h m.	15°	—255,3°	—244,3°
15.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	—258,9°	—257,3°
	3^h 30′ p.m.	15°	—258,9°	—255,5°

Protokoll 3 (a und b).

$c_a = 0{,}53\,\%$ und $c_b = 0{,}28\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0008 und 1,0004.
Vorheriges Erwärmen: 7^h 30′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 15° konstant.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung: c_a	Spezifische Drehung: c_b
17.3.09	4^h p.m.	19°, 21°	—123,5°	—110,7°
	5^h p.m.	15°	—203,6°	—139,0°
	6^h p.m.	15°	—216,8°	—185,6°
	11^h p.m.	15°	—236,6°	—212,4°
18.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	—242,3°	—224,9°
	3^h 30′ p.m.	15°	—250,7°	—228,5°
	6^h p.m.	15°	—250,7°	—224,9°
19.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	—252,6°	—237,4°
	3^h 30′ p.m.	15°	—252,6°	—239,2°
	6^h p.m.	15°	—255,5°	—239,2°
20.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	—253,6°	—237,4°

Protokoll 4 (a und b).

$c_a = 0{,}47\,\%$ und $c_b = 0{,}24\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0008 und 1,0004.
Vorheriges Erwärmen: 7^h 30′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 15° konstant.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung: c_a	Spezifische Drehung: c_b
23.3.09	4^h p.m.	21°, 19°	—122,2°	—102,0°
	5^h p.m.	15°	—196,7°	—145,8°
	6^h p.m.	15°	—198,8°	—164,5°
	12^h p.m.	15°	—216,9°	—177,0°
24.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	—242,4°	—210,3°
	3^h 30′ p.m.	15°	—240,2°	—212,4°
	6^h p.m.	15°	—242,4°	—212,4°
25.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	—245,6°	—212,4°
	3^h 30′ p.m.	15°	—246,6°	—214,5°
	6^h p.m.	15°	—246,6°	—212,4°
26.3.09	9^h 30′ a.m.	15°	—250,9°	—214,5°
	12^h p.m.	15°	—248,7°	—216,6°

[1]) Von den fettgedruckten Werten ab wurde die Drehung als konstant betrachtet.

Protokoll 5.

$c = 0{,}40\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,002.
Vorheriges Erwärmen: 5′ auf 60°.
Beginn der Polarisation: 55′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 15° konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung
15. 12. 08	10h 15′ a. m.	−202,1°
	11h 15′ a. m.	−249,5°
	12h 15′ p. m.	−254,5°
	3h 30′ p. m.	−273,2°
	5h p. m.	−272,0°
	6h 30′ p. m.	−280,7°
	10h p. m.	−289,4°
16. 12. 08	9h 30′ a. m.	−287,0°
	11h a. m.	−287,0°
	3h p. m.	−290,7°
	5h p. m.	−293,2°
	6h 15′ p. m.	−289,4°
	9h 30′ p. m.	−295,7°
17. 12. 08	9h 15′ a. m.	−301,9°
	12h m.	−295,7°
	3h 30′ p. m.	−300,7°
	6h p. m.	−295,7°
	8h 30′ p. m.	−299,4°
	11h 30′ p. m.	−299,4°
18. 12. 08	9h 30′ a. m.	−300,7°
	12h 30′ p. m.	−303,1°
	5h p. m.	−296,9°
	10h p. m.	−296,9°
19. 12. 08	9h 15′ a. m.	−300,7°
	1h p. m.	−299,4°
	3h 30′ p. m.	−293,2°
	5h 45′ p. m.	−290,7°
20. 12. 08	10h a. m.	−293,2°
	11h 45′ a. m.	−293,2°
	10h p. m.	−291,9°
21. 12. 08	9h 15′ a. m.	−298,2°
	12h 30′ p. m.	−294,4°
	4h 45′ p. m.	−293,2°
	12h p. m.	−291,9°
22. 12. 08	8h a. m.	−290,7°
	9h a. m.	−293,2°
	1h p. m.	−291,9°
	3h 30′ p. m.	−291,9°
	6h 30′ p. m.	−293,2°
23. 12. 08	9h 30′ a. m.	−290,7°
	11h a. m.	−290,7°
	3h 15′ p. m.	−290,7°
	6h p. m.	−291,9°
	10h p. m.	−289,4°

Protokoll 5 (Fortsetzung).

Datum	Zeit	Spezifische Drehung
24. 12. 08	9h 30′ a. m.	−291,9°
	12h m.	−291,9°
	9h p. m.	−291,9°
25. 12. 08	9h a. m.	−291,9°
	10h 30′ p. m.	−289,4°
26. 12. 08	10h a. m.	−290,7°
	11h p. m.	−288,2°
27. 12. 08	9h a. m.	−288,2°
	12h m.	−290,7°
28. 12. 08	9h a. m.	−290,7°
	12h 45′ p. m.	−290,7°
	5h 30′ p. m.	−288,2°
29. 12. 08	10h 30′ a. m.	−290,7°
	1h p. m.	−289,4°
	5h p. m.	−290,7°
30. 12. 08	9h a. m.	−290,7°
	12h 30′ p. m.	−291,9°
	6h 45′ p. m.	−289,4°
31. 12. 08	10h a. m.	−290,7°

Protokoll 6.

$c = 0{,}42\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0011.
Vorheriges Erwärmen: 8h 20′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 25′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 15° konstant.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
25.2.09	4h 45′ p. m.	22°	−104,6°
	5h 45′ p. m.	15°	−147,4°
	6h 30′ p. m.	15°	−166,4°
	12h p. m.	15°	−193,8°
26.2.09	9h 30′ a. m.	15°	−211,6°
	12h m.	15°	−215,2°
	3h 30′ p. m.	15°	−211,6°
	11h p. m.	15°	−219,9°
27.2.09	9h a. m.	15°	−219,9°
	3h 30′ p. m.	15°	−223,5°
	5h 30′ p. m.	15°	−224,7°
28.2.09	10h a. m.	15°	−233,0°
	9h p. m.	15°	−237,7°
1.3.09	9h 30′ a. m.	15°	−240,1°
	3h 30′ p. m.	15°	−246,1°
	6h 30′ p. m.	15°	−244,9°
2.3.09	9h 30′ a. m.	15°	−242,5°
	3h 30′ p. m.	15°	−243,7°
	6h p. m.	15°	−242,5°
3.3.09	9h 30′ a. m.	15°	−244,9°
	3h 15′ p. m.	15°	−246,1°

Protokoll 7 (a und b).

$c_a = 0{,}45\,\%$ und $c_b = 0{,}22\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0009 und 1,0006.
Vorheriges Erwärmen: $7^h\,30'$ auf 80^0.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 20^0 konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung c_a	Spezifische Drehung c_b
26.3.09	4^h p.m.	$-144{,}3^0$	$-122{,}7^0$
	5^h p.m.	$-174{,}3^0$	$-138{,}6^0$
	6^h p.m.	$-175{,}4^0$	$-145{,}4^0$
	$10^h\,30'$ p.m.	$-174{,}3^0$	$-159{,}0^0$
27.3.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-192{,}1^0$	$-168{,}1^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-196{,}5^0$	$-172{,}6^0$
	6^h p.m.	$-197{,}6^0$	$-184{,}0^0$
28.3.09	10^h a.m.	$-203{,}2^0$	$-188{,}5^0$
29.3.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-214{,}3^0$	$-193{,}1^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-228{,}7^0$	$-195{,}3^0$
	6^h p.m.	$-226{,}5^0$	$-195{,}3^0$
30.3.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-227{,}6^0$	$-202{,}2^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-226{,}5^0$	$-195{,}3^0$
	6^h p.m.	$-228{,}7^0$	$-197{,}6^0$
31.3.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-226{,}5^0$	$-197{,}6^0$
	12^h m.	$-225{,}4^0$	$-202{,}2^0$

Protokoll 8 (a und b).

$c_a = 0{,}48\,\%$ und $c_b = 0{,}25\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,001 und 1,0006.
Vorheriges Erwärmen: $7^h\,30'$ auf 80^0.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 20^0 konstant.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung c_a	Spezifische Drehung c_b
31.3.09	4^h p.m.	23^0, 22^0	$-143{,}6^0$	$-127{,}9^0$
	5^h p.m.	20^0	$-160{,}3^0$	$-141{,}9^0$
	6^h p.m.	20^0	$-162{,}3^0$	$-149{,}9^0$
	10^h p.m.	20^0	$-182{,}1^0$	$-171{,}9^0$
1.4.09	$9^h\,30'$ a.m.	20^0	$-192{,}5^0$	$-175{,}9^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	20^0	$-192{,}5^0$	$-169{,}9^0$
	6^h p.m.	20^0	$-191{,}5^0$	$-171{,}9^0$
2.4.09	$9^h\,30'$ a.m.	20^0	$-198{,}8^0$	$-179{,}9^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	20^0	$-198{,}8^0$	$-187{,}9^0$
	6^h p.m.	20^0	$-200{,}8^0$	$-183{,}9^0$
3.4.09	$9^h\,30'$ a.m.	20^0	$-202{,}9^0$	$-187{,}9^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	20^0	$-198{,}8^0$	$-195{,}9^0$
	6^h p.m.	20^0	$-206{,}0^0$	$-189{,}9^0$
4.4.09	$9^h\,30'$ a.m.	20^0	$-210{,}2^0$	$-193{,}9^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	20^0	$-209{,}2^0$	$-191{,}9^0$
5.4.09	$9^h\,30'$ a.m.	20^0	$-207{,}1^0$	$-193{,}9^0$

Protokoll 9.

$c = 0{,}76\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0022.
Vorheriges Erwärmen: $7^h\,30'$ auf 80^0.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 20^0 konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung
13.5.09	4^h p.m.	$-141{,}1^0$
	5^h p.m.	$-174{,}6^0$
	6^h p.m.	$-190{,}4^0$
	12^h p.m.	$-208{,}8^0$
14.5.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-217{,}9^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-222{,}5^0$
	6^h p.m.	$-221{,}2^0$
15.5.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-229{,}1^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-230{,}4^0$
	6^h p.m.	$-235{,}0^0$
16.5.09	10^h a.m.	$-240{,}9^0$
17.5.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-242{,}2^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-240{,}3^0$
	6^h p.m.	$-242{,}9^0$
18.5.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-242{,}2^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-239{,}6^0$
	6^h p.m.	$-241{,}6^0$
19.5.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-242{,}9^0$

Protokoll 10 (a und b).

$c_a = 0{,}47\,\%$ und $c_b = 0{,}23\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0013 und 1,0011.
Vorheriges Erwärmen: $7^h\,30'$ auf 80^0.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 25^0 konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung c_a	Spezifische Drehung c_b
14.4.09	4^h p.m.	$-111{,}6^0$	$-102{,}1^0$
	5^h p.m.	$-122{,}2^0$	$-110{,}8^0$
	6^h p.m.	$-128{,}6^0$	$-119{,}4^0$
	11^h p.m.	$-134{,}9^0$	$-128{,}1^0$
15.4.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-145{,}6^0$	$-139{,}0^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-146{,}6^0$	$-149{,}8^0$
	6^h p.m.	$-145{,}6^0$	$-147{,}7^0$
16.4.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-148{,}7^0$	$-145{,}5^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-149{,}8^0$	$-147{,}7^0$
	6^h p.m.	$-151{,}9^0$	$-149{,}8^0$
17.4.09	$9^h\,30'$ a.m.	$-151{,}9^0$	$-143{,}3^0$
	$3^h\,30'$ p.m.	$-151{,}9^0$	$-145{,}5^0$
	6^h p.m.	$-153{,}0^0$	$-143{,}3^0$

Protokoll 10 (a u. b) (Fortsetzung).

Datum	Zeit	Spezifische Drehung c_a	Spezifische Drehung c_b
18.4.09	9h 30′ a. m.	—155,1°	—145,5°
19.4.09	9h 30′ a. m.	—158,3°	—147,7°
	3h 30′ p. m.	—156,2°	—149,8°
	6h p. m.	—158,3°	—149,8°
20.4.09	9h 30′ a. m.	—159,4°	—143,3°
	3h 30′ p. m.	—160,4°	—145,5°
	6h p. m.	—160,4°	—149,8°
21.4.09	9h 30′ a. m.	—161,5°	—147,7°
	3h 30′ p. m.	—160,4°	—145,5°
	6h p. m.	—161,5°	—147,7°
22.4.09	9h 30′ a. m.	—161,5°	—149,8°

Protokoll 11 (a und b).

$c_a = 0{,}48\,\%$ und $c_b = 0{,}24\,\%$.

Spezifisches Gewicht: 1,0013 und 1,0011.

Vorheriges Erwärmen: 7h 30′ auf 80°.

Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.

Beobachtungstemperatur: 25° konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung c_a	Spezifische Drehung c_b
22.4.09	4h p. m.	—131,1°	—120,7°
	5h p. m.	—134,2°	—124,9°
	5h p. m.	—137,3°	—127,0°
	11h p. m.	—142,5°	—129,0°
23.4.09	9h 30′ a. m.	—142,5°	—127,0°
	3h 30′ p. m.	—143,6°	—131,1°
	6h p. m.	—145,7°	—131,1°
24.4.09	9h 30′ a. m.	—147,7°	—133,2°
	3h 30′ p. m.	—149,8°	—135,3°
	6h p. m.	—148,8°	—135,3°
25.4.09	9h 30′ a. m.	—151,9°	—139,4°
26.4.09	9h 30′ a. m.	—152,9°	—137,4°
	3h 30′ p. m.	—154,0°	—139,4°
	6h p. m.	—154,0°	—139,4°
27.4.09	9h 30′ a. m.	—155,0°	—137,4°
	3h 30′ p. m.	—155,0°	—139,4°
	6h p. m.	—156,1°	—139,4°
28.4.09	9h 30′ a. m.	—158,1°	—141,5°
	3h 30′ p. m.	—155,0°	—141,5°
	6h p. m.	—156,1°	—139,4°
29.4.09	9h 30′ a. m.	—156,1°	—141,5°
	3h 30′ p. m.	—158,1°	—137,4°
	6h p. m.	—157,1°	—139,4°
30.4.09	9h 30′ a. m.	—157,1°	—137,4°

Protokoll 12.

$c = 0{,}90\,\%$.

Spezifisches Gewicht: 1,0025.

Vorheriges Erwärmen: 7h 30′ auf 80°.

Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.

Beobachtungstemperatur: 25° konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung
19. 5. 09	4h p. m.	—156,8°
	5h p. m.	—162,9°
	6h p. m.	—181,8°
	10h p. m.	—178,5°
20. 5. 09	—	—
21. 5. 09	9h 30′ a. m.	—184,0°
	3h 30′ p. m.	—182,3°
	6h p. m.	—182,9°
22. 5. 09	9h 30′ a. m.	—184,0°
	3h 30′ p. m.	—182,9°
	6h p. m.	—185,1°
23. 5. 09	10h a. m.	—188,4°
24. 5. 09	9h 30′ a. m.	—190,1°
	3h 30′ p. m.	—190,1°
	6h p. m.	—190,6°
25. 5. 09	9h 30′ a. m.	—190,6°

Protokoll 13 (a und b).

$c_a = 0{,}43\,\%$ und $c_b = 0{,}45\,\%$.

Spezifisches Gewicht: 1,0013 und 1,0013.

Vorheriges Erwärmen: a) 7h 30′ auf 80° und b) 5′ auf 80°.

Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.

Beobachtungstemperatur: 25° konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung a	Spezifische Drehung b
9.6.09	4h p. m.	—130,1°	—139,8°
	5h p. m.	—145,2°	—147,6°
	6h p. m.	—145,2°	—146,5°
	12h p. m.	—154,5°	—165,3°
10.6.09	9h 30′ a. m.	—161,4°	—178,7°
	3h 30′ p. m.	—159,1°	—178,7°
	6h p. m.	—161,4°	—177,6°
11.6.09	9h 30′ a. m.	—159,1°	—184,2°
	3h 30′ p. m.	—157,9°	—182,0°
	6h p. m.	—160,3°	—177,6°

Protokoll 13 (a u. b) (Fortsetzung).

Datum	Zeit	Spezifische Drehung a	Spezifische Drehung b
12.6.09	9h 30′ a. m.	−169,5°	−202,0°
	3h 30′ p. m.	−169,5°	−198,6°
	6h p. m.	−167,2°	−199,7°
13.6.09	9h a. m.	−167,2°	−200,9°
14.6.09	9h 30′ a. m.	−173,0°	−199,7°
	3h 30′ p. m.	−173,0°	−200,9°
	6h p. m.	−169,5°	−197,5°
15.6.09	9h 30′ a. m.	−170,7°	−202,0°
	3h 30′ p. m.	−168,4°	−202,0°
	6h p. m.	−171,9°	−198,6°

Protokoll 14 (a und b).

$c_a = 0{,}46\,\%$ und $c_b = 0{,}23\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0015 und 1,0012.
Vorheriges Erwärmen: 7h 30′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 30° konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung c_a	Spezifische Drehung c_b
6.5.09	4h p. m.	−131,3°	−125,9°
	5h p. m.	−128,1°	−130,3°
	6h p. m.	−129,2°	−130,3°
	11h p. m.	−127,0°	−134,6°
7.5.09	9h 30′ a. m.	−129,2°	−130,3°
	3h 30′ p. m.	−130,2°	−130,3°
	6h p. m.	−129,2°	−130,3°
8.5.09	9h 30′ a. m.	−130,2°	−128,1°
	3h 30′ p. m.	−130,2°	−128,1°
	6h p. m.	−130,2°	−130,3°
9.5.09	12h 30′ p. m.	−129,2°	−130,3°
10.5.09	9h 30′ a. m.	−129,2°	−130,3°
	3h 30′ p. m.	−131,3°	−128,1°
	6h p. m.	−130,2°	−128,1°
11.5.09	9h 30′ a. m.	−131,3°	−130,3°
	3h 30′ p. m.	−125,9°	−134,6°
	6h p. m.	−125,9°	−132,5°
12.5.09	9h 30′ a. m.	−129,2°	−128,1°
	3h 30′ p. m.	−131,3°	—

Protokoll 15.

$c = 0{,}48\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0015.
Vorheriges Erwärmen: 7h 30′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 30° konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung
30. 4. 09	4h p. m.	— 122,7°
	5h p. m.	— 123,8°
	6h p. m.	— 123,8°
	9h p. m.	— 120,7°
1. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 124,8°
	3h 30′ p. m.	— 123,8°
	6h p. m.	— 124,8°
2. 5. 09	9h a. m.	— 123,8°
3. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 126,9°
	3h 30′ p. m.	— 125,9°
	6h p. m.	— 123,8°
4. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 124,8°
	3h 30′ p. m.	— 126,9°
	6h p. m.	— 126,9°
5. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 124,8°
	3h 30′ p. m.	— 123,8°
	6h p. m.	— 123,8°
6. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 124,8°

Protokoll 16.

$c = 0{,}79\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0023.
Vorheriges Erwärmen: 7h 30′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 30° konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung
24. 5. 09	4h p. m.	— 138,3°
	5h p. m.	— 142,1°
	6h p. m.	— 138,9°
	11h p. m.	— 142,7°
25. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 138,3°
	3h 30′ p. m.	— 142,1°
	6h p. m.	— 140,2°
26. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 138,9°
	3h 30′ p. m.	— 138,9°
	6h p. m.	— 138,3°
27. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 140,8°
	3h 30′ p. m.	— 137,7°
	6h p. m.	— 138,9°
28. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 142,7°
	3h 30′ p. m.	— 139,6°
	6h p. m.	— 141,5°
29. 5. 09	9h 30′ a. m.	— 138,3°

Protokoll 17.

$c = 1{,}49\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,003.
Vorheriges Erwärmen: $7^h\,30'$ auf 80^0.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 30^0 konstant.

Datum	Zeit	Spezifische Drehung
2. 6. 09	4^h p. m.	— 133,2°
	5^h p. m.	— 135,5°
	6^h p. m.	— 134,8°
	10^h p. m.	— 146,2°
3. 6. 09	$9^h\,30'$ a. m.	— 142,5°
	$3^h\,30'$ p. m.	— 144,9°
	6^h p. m.	— 145,5°
4. 6. 09	$9^h\,30'$ a. m.	— 144,5°
	$3^h\,30'$ p. m.	— 143,9°
	6^h p. m.	— 145,2°
5. 6. 09	$9^h\,30'$ a. m.	— 145,2°
	$3^h\,30'$ p. m.	— 143,5°
	6^h p. m.	— 144,2°
6. 6. 09	$9^h\,30'$ a. m.	— 145,5°
7. 6. 09	$9^h\,30'$ a. m.	— 144,5°
	$3^h\,30'$ p. m.	— 143,2°
	6^h p. m.	— 144,2°

Protokoll 18.

$c = 0{,}40\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0015.
Vorheriges Erwärmen: 1^h auf 80^0.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.

Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
$9^h\,30'$ a. m.	25°	— 119,8°
$10^h\,15'$ a. m.	30°	— 111,1°
$10^h\,30'$ a. m.	35°	— 99,9°
$10^h\,45'$ a. m.	40°	— 97,4°
11^h a. m.	55°	— 106,1°
$11^h\,30'$ a. m.	65°	— 102,3°
12^h m.	75°	— 99,9°

Protokoll 19.

$c = 0{,}30\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0004.
Vorheriges Erwärmen: 1^h auf 80^0.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.

Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
10^h a. m.	25°	— 139,9°
$10^h\,55'$ a. m.	18°	— 194,9°
$11^h\,5'$ a. m.	25°	— 163,3°
$11^h\,15'$ a. m.	35°	— 133,3°
$11^h\,25'$ a. m.	40°	— 128,3°
$11^h\,40'$ a. m.	55°	— 125,0°
12^h m.	65°	— 126,6°
$12^h\,35'$ p. m.	80°	— 128,3°

Protokoll 20.

Von der zu vorstehendem Versuch verwendeten Lösung wurde ein Teil im Zimmer aufbewahrt und 24^h später nochmals in ähnlicher Weise untersucht.

Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
$9^h\,45'$ a. m.	18°	— 251,5°
$11^h\,5'$ a. m.	25°	— 224,9°
$11^h\,25'$ a. m.	35°	— 144,9°
$11^h\,35'$ a. m.	40°	— 128,3°
$11^h\,50'$ a. m.	55°	— 123,3°
12^h m.	65°	— 130,3°
$12^h\,30'$ p. m.	75°	— 131,6°

Protokoll 21.

$c = 0{,}42\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,001.
Vorheriges Erwärmen: 8^h auf 80^0.
Beginn der Polarisation: 17^h nach Beendigung des Erwärmens.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
9.12.08	12^h m.	15°	—237,9°
	1^h p. m.	15°	—243,8°
	$3^h\,15'$ p. m.	15°	—245,0°
	$4^h\,15'$ p. m.	15°	—242,6°
	$5^h\,13'$ p. m.	15°	—249,8°
	$6^h\,15'$ p. m.	15°	—249,8°
	7^h p. m.	15°	—250,9°
	8^h p. m.	15°	—248,6°
	10^h p. m.	15°	—247,4°
10.12.08	7^h a. m.	15°	—252,1°
	$9^h\,30'$ a. m.	15°	—252,1°
	$11^h\,45'$ a. m.	5°	—277,1°
	$12^h\,45'$ p. m.	5°	—284,2°
	$3^h\,15'$ p. m.	5°	—277,1°
	$4^h\,15'$ p. m.	5°	—284,2°
	$5^h\,15'$ p. m.	5°	—279,5°
	$6^h\,15'$ p. m.	5°	—281,9°
	8^h p. m.	10°	—273,5°
	$11^h\,30'$ p. m.	12,5°	—273,5°

Protokoll 21 (Fortsetzung).

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
11.12.08	8h 30′ a. m.	13,5°	−268,8°
	9h 15′ a. m.	13°	−261,6°
	12h m.	50°	−122,5°
	12h 15′ p. m.	50°	−127,3°
	12h 45′ p. m.	50°	−124,9°
	1h p. m.	50°	−124,9°
	3h 45′ p. m.	15°	−221,2°
	5h p. m.	15°	−231,9°
	6h p. m.	15°	−240,2°
	7h p. m.	15°	−237,9°
	10h p. m.	15°	−247,4°
12.12.08	8h a. m.	15°	−249,8°
	9h 30′ a. m.	15°	−248,6°
	11h 15′ a. m.	15°	−250,9°
	3h 30′ p. m.	15°	−250,9°
	4h 15′ p. m.	15°	−252,1°

Protokoll 22.

c = 0,42%.
Spezifisches Gewicht: 1,001.
Vorheriges Erwärmen: 5′ auf 60°.
Beginn der Polarisation: 25′ nach Beendigung des Erwärmens.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
4.12.08	10h a. m.	25°	−145,1°
	11h a. m.	19°	−203,4°
	12h m.	19°	−218,8°
	1h p. m.	19°	−217,6°
	3h 15′ p. m.	19°	−246,2°
	6h p. m.	50°	−116,6°
	6h 45′ p. m.	33°	−136,8°
5.12.08	9h 15′ a. m.	17°	−259,3°
	11h 15′ a. m.	17°	−260,5°
	12h 30′ p. m.	17°	−255,7°
	3h 15′ p. m.	17°	−260,5°
	5h p. m.	17°	−262,8°
	6h 30′ p. m.	17,5°	−259,3°
	11h 30′ p. m.	17°	−275,9°
6.12.08	9h a. m.	16°	−270,0°
	10h 30′ a. m.	16°	−274,7°
	11h 30′ a. m.	16,5°	−266,4°
	1h 30′ p. m.	16,5°	−273,5°
	11h 30′ p. m.	15,5°	−273,5°
7.12.08	9h 30′ a. m.	15°	−275,9°
	12h 15′ p. m.	10°	−278,3°
	1h p. m.	10°	−278,3°
	4h p. m.	5°	−297,3°
	5h p. m.	5°	−296,1°
	6h p. m.	5°	−298,5°
	7h 15′ p. m.	16°	−264,0°
	11h 45′ p. m.	15,5°	−279,5°

Protokoll 23.

c = 0,43%.
Spezifisches Gewicht: 1,0002.
Vorheriges Erwärmen: 6h 30′ auf 80°.
Beginn der Polarisation: 1h 15′ nach Beendigung des Erwärmens.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
30.11.08	4h 45′ p. m.	23°	−151,1°
	5h 45′ p. m.	21°	−175,5°
	6h 45′ p. m.	20°	−183,7°
	7h 45′ p. m.	20°	−194,1°
1.12.08	9h 45′ a. m.	19,5°	−231,3°
	11h 45′ a. m.	20°	−238,3°
	3h p. m.	21°	−226,7°
	6h 15′ p. m.	16°	−240,6°
	7h 15′ p. m.	17°	−241,8°
2.12.08	9h 45′ a. m.	18,5°	−259,2°
	12h 30′ p. m.	18°	−255,8°
	3h 15′ p. m.	19°	−255,8°
	5h p. m.	21°	−251,1°
	6h p. m.	21°	−247,6°
3.12.08	9h 30′ a. m.	19°	−255,8°

Protokoll 24.

c = 3,32%.
Spezifisches Gewicht: 1,0083.
Vorheriges Erwärmen: 1h auf 100°.
Beginn der Polarisation: 10′ nach Beendigung des Erwärmens.

Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
5h 40′ p. m.	25°	−167,3°
5h 50′ p. m.	18°	−180,7°
5h 55′ p. m.	17°	−206,1°
6h p. m.	16°	−209,1°

Protokoll 25.

c = 1,87%.
Spezifisches Gewicht: 1,005.
Vorheriges Erwärmen: 1h auf 100°.
Beginn der Polarisation: 15′ nach Beendigung des Erwärmens.

Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
5h 15′ p. m.	26°	−149,0°
5h 25′ p. m.	21,5°	−159,6°
5h 35′ p. m.	18°	−205,4°

Protokoll 26.

$c = 0{,}29\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0003.
Vorheriges Erwärmen: 20h auf 100°.
Beginn der Polarisation: 16h nach Beendigung des Erwärmens.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
6. 2. 09	10h 45′ a. m.	15°	−163,7°
	12h 30′ p. m.	15°	−156,9°
	5h 45′ p. m.	15°	−156,9°
7. 2. 09	11h 45′ a. m.	15°	−160,3°
8. 2. 09	9h 45′ a. m.	15°	−162,0°
	3h 30′ p. m.	65°	− 75,8°
	3h 45′ p. m.	65°	− 74,1°
	4h p. m.	65°	− 70,7°

Protokoll 27.

$c = 0{,}82\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0017.
Vorheriges Erwärmen: 64h auf 100°.
Beginn der Polarisation: 20′ nach Beendigung des Erwärmens.
Beobachtungstemperatur: 15° konstant.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
19. 2. 09	10h 50′ a. m.	24°	−133,3°
	11h 5′ a. m.	16°	−136,4°
	12h m.	15°	−137,0°
	12h 30′ p. m.	15°	−137,6°
	4h p. m.	15°	−139,4°
	6h 30′ p. m.	15°	−139,4°
20. 2. 09	9h a. m	15°	−141,2°
	12h m.	15°	−141,2°
	3h 30′ p. m.	15°	−141,2°
	6h 30′ p. m.	15°	−139,4°
21. 2. 09	12h m.	15°	−143,1°
22. 2. 09	9h 30′ a. m.	15°	−143,1°
	4h 30′ p. m.	15°	−141,8°
	6h 30′ p. m.	15°	−142,4°
23. 2. 09	9h 30′ a. m.	15°	−142,4°

Protokoll 28.

$c = 0{,}79\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0013.
Vorheriges Erwärmen: 228h auf 100°.
Beginn der Polarisation: 45′ nach Beendigung des Erwärmens.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
15. 3. 09	6h 45′ p. m.	15°	−131,5°
	12h p. m.	15°	−134,6°
16. 3. 09	9h 30′ a. m.	15°	−135,9°
	7h p. m.	15°	−135,9°
17. 3. 09	9h 30′ a. m.	15°	−137,2°
	2h 50′ p. m.	65°	− 96,1°
	3h p. m.	65°	− 93,6°
	3h 10′ p. m.	65°	− 96,7°
	3h 20′ p. m.	65°	− 95,4°

Protokoll 29.

$c = 0{,}38\,\%$.
Spezifisches Gewicht: 1,0009.
Vorheriges Erwärmen: 45h auf 100°.
Beginn der Polarisation: 30′ nach Beendigung des Erwärmens.

Datum	Zeit	Temperatur	Spezifische Drehung
18.10.09	4h p. m.	25°	−123,6°
	5h p. m.	20°	−127,5°
	6h p. m.	20°	−127,5°
	12h p. m.	20°	−123,6°
19.10.09	9h a. m.	20°	−124,9°
	3h p. m.	20°	−126,2°
	6h p. m.	20°	−126,2°
20.10.09	9h a. m.	20°	−124,9°
	3h p. m.	20°	−123,6°
	3h 25′ p. m.	25°	−123,6°
	4h 30′ p. m.	30°	−122,3°
	4h 45′ p. m.	35°	−117,0°
	5h 10′ p. m.	40°	−113,1°
	5h 25′ p. m.	50°	−110,4°
	5h 40′ p. m.	55°	−109,1°
	5h 50′ p. m.	65°	−109,1°
	6h 5′ p. m.	75°	−107,8°

Die Ergebnisse der Untersuchung des Drehungsvermögens des Leims können kurz in folgende Punkte zusammengefaßt werden:

1. Die optische Aktivität frischer Leimlösungen ist (auch bei konstanter Temperatur) mit der Zeit veränderlich und erreicht erst nach 12h bis 120h ihr Maximum. Dieser

Vorgang ist umkehrbar, indem sich durch Erwärmen die Ablenkung einer gealterten Leimlösung wieder auf ihren Anfangswert reduzieren läßt.

2. Die optische Aktivität der Leimlösungen ist ferner von der Temperatur abhängig insofern, als die Ablenkung mit steigender Temperatur abnimmt und bei ca. 35° ein Minimum erreicht.

Für die Temperaturen von 15, 20, 25 und 30° konnten die Werte der Linksdrehung und ihre Änderung mit der Zeit genauer festgelegt werden.

3. Die optische Aktivität ist nicht proportional der Konzentration, es läßt sich hingegen sagen, daß der schwächeren Konzentration stets eine geringere Linksdrehung zukommt.

4. Die Ablenkung ist endlich um so geringer, je länger und höher die Leimlösung vor der Beobachtung erwärmt wurde.

5. Bezüglich des Drehungsvermögens des β-Leims ist als charakteristisch zu bemerken, daß es beträchtlich geringer ist als das des gewöhnlichen α-Leims.

Zu Beginn der voraufgehenden Arbeit war angedeutet worden, daß die zeitliche Änderung des Tanninbindungsvermögens sowie die der Linksdrehung des Leims in einer einfachen Beziehung zueinander stehen.

Wie aus den mitgeteilten Beobachtungen hervorgeht, nimmt das Bindungsvermögen zunächst rasch, dann langsamer ab, während das Drehungsvermögen im wesentlichen das umgekehrte Verhalten zeigt, also in gleicher Weise zunimmt.

Beide Erscheinungen verlaufen also spiegelbildlich zueinander und sind als Äußerungen einer Zustandsänderung der Leimlösung aufzufassen, die man mit dem Namen „Hysteresis" zu bezeichnen pflegt.

Die Hysteresis ist als spezifische Erscheinung der Kolloide schon seit Graham bekannt und an zahlreichen kolloiden Systemen in der verschiedensten Weise beobachtet worden.

Für den Leim speziell ist sie von v. Schroeder[1]) durch Bestimmung der inneren Reibung wässeriger Lösungen gemessen worden, seine Beobachtungen sind jedoch auf einen Zeitraum von höchstens 24[h] ausgedehnt, so daß sie keinen so weitgehenden Einblick in den Verlauf der Hysteresis gewähren, wie die beiden oben genannten Erscheinungen.

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 45, 75, 1903.

v. Schroeders Beobachtungen haben im wesentlichen ergeben, daß die innere Reibung einer Gelatinelösung (bei konstanter Temperatur) mit der Zeit zunimmt, daß sie mit Erhöhung der Temperatur abnimmt und daß längeres Erhitzen eine dauernde Herabsetzung der inneren Reibung zur Folge hat.

Wie ersichtlich, ist also die innere Reibung von bestimmten Faktoren in völlig gleicher Weise abhängig wie die optische Aktivität, beide Vorgänge verlaufen demnach parallel zueinander.

Über die eigentliche Ursache der drei vorbenannten Erscheinungen gibt vielleicht eine Arbeit Aufschluß, die in jüngster Zeit von W. Menz[1]) veröffentlicht worden ist.

Dieser Autor fand, daß heiße Leimlösungen unter dem Ultramikroskop einen schwachen, unauflöslichen Lichtkegel zeigen, und daß sich beim Erkalten (auch bei nicht erstarrenden Lösungen) unzählige Submikronen im Gesichtsfeld bilden. Diese vergrößern sich durch Altern kurz nach der Bereitung der Lösung.

Das läßt den Schluß zu, daß die Hysteresis durch eine Änderung des Dispersitätsgrades bedingt ist, indem sich in der Leimlösung unter dem Einfluß der Wärme beim Lösungsprozeß außerordentlich kleine Masseteilchen (sog. Amikronen) bilden, die sich auch ultramikroskopisch nicht sichtbar machen lassen. Diese Amikronen nehmen beim Abkühlen mit der Zeit an Größe zu, sie werden ultramikroskopisch als Submikronen sichtbar, und es ist anzunehmen, daß diese Größenzunahme mit der Zeit eine sehr weit gehende ist.

Die in einer bestimmten Lösung verfügbare Oberfläche dieser Teilchen würde also beträchtlich an Größe abnehmen, woraus sich recht gut die Verminderung des Tanninbindungsvermögens (da auf Adsorption beruhend) erklären ließe.

Ebenso lassen sich die Änderungen der Viscosität sowie des optischen Verhaltens recht gut dieser Anschauung unterordnen.

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 66, 129, 1909.

Über Phosphorsäure- und Schwefelsäureester von Kohlenhydraten.[1])

Von

C. Neuberg und H. Pollak.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

Der Phosphor zählt zu den wenigen Elementen, die in der Natur in organischer Bindungsform vorkommen. Phosphorhaltige Eiweißkörper, wie das Casein und das Vitelin, und phosphorhaltige Lipoide, wie das Lecithin, sind seit langer Zeit bekannt. Jüngeren Datums ist unser Wissen von weniger kompliziert gebauten phosphorhaltigen Naturstoffen, z. B. von den Nucleinsäuren, deren einfachsten Vertreter die Inosinsäure darstellt. Alle diese Substanzen besitzen eine große biologische Bedeutung, da sie anerkanntermaßen an zahlreichen physiologischen Vorgängen beteiligt sind. Der künstliche Aufbau dieser phosphorhaltigen Naturprodukte ist bisher kaum versucht oder höchstens zu Bruchstücken gediehen; so ist die Synthese der Glycerinphosphorsäure, die einen Teil des Lecithins bildet, ausgeführt worden; allein diese künstliche Substanz ist nur ein Isomeres des Naturstoffes.

Eine besondere Beachtung verdienen die Phosphorsäureester der Kohlenhydrate. Denn nach Untersuchungen von Kossel, Bang, Steudel, Neuberg u. a. ist jetzt die Vorstellung begründet, daß den im Tier- und Pflanzenreiche weit verbreiteten Nucleinsäuren ein Kohlenhydratphosphorsäureskelett zugrunde liegt, an das sich andere Gruppen, wie Purine, Pyrimidine, angliedern, in ähnlicher Weise, wie Cholin und Fett-

[1]) Siehe auch C. Neuberg und H. Pollak, Über Kohlenhydratphosphorsäureester. I. Über Saccharosephosphorsäure. Diese Zeitschr. 23, 515, 1910 und C. Neuberg und H. Pollak, Über Kohlenhydratphosphorsäureester II. Über Saccharoseschwefelsäure und die Phosphorylierung von Eiweiß. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, Heft 11, 1910.

säuren mit der Glycerinphosphorsäure zum Lecithin verknüpft sind. Liegt einzelnen Nucleinsäuren eine Pentosephosphorsäure[1]), anderen eine Hexosephosphorsäure[2]) zugrunde, so handelt es sich bei bestimmten phosphorhaltigen Lipoiden, die jetzt unter dem Namen Phosphatide zusammengefaßt werden, um eine Galaktosephosphorsäure. Auch im freien Zustande kommen solche Phosphorsäureester vor, wie das Beispiel des in zahlreichen Pflanzen auftretenden Phytins lehrt. Letzteres ist zwar kein Derivat der gewöhnlichen Zucker, sondern ist als Abkömmling des zyklischen Inosits, als Inositphosphorsäure[3]), erkannt.

Seit Jahrzehnten hat die Erfahrung gelehrt, daß der in organischer Bindung vorhandene Phosphor auch im intermediären Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Ist dieselbe auch nicht in ihren Einzelheiten aufgeklärt, so hat sich in einem besonderen Falle, im Stoffwechsel der Hefe, ihre Bedeutung zu erkennen gegeben. Harden und Young[4]), E. Buchner und Antoni[5]), Iwanow[6]) und v. Lebedew[7]) zeigten, daß anorganische Phosphorsäure bzw. Phosphate als sogenanntes Koenzym der Zymase bei der Alkoholbildung wirken, und Harden und Young klärten diesen Vorgang durch Isolierung von Hexosediphosphorsäure in Substanz dahin auf, daß es sich um eine vorübergehende Bildung von Phosphorsäureestern des gärenden Zuckers handelt, der im Gärungsprozeß wieder zerfällt und das Koenzym zurückbildet. Hier leitet die Phosphorsäure, die wie ein wasserentziehendes Mittel wirkt, den Zerfall des Zuckermoleküls zu den kleineren, alkoholliefernden Stücken ein.[8]) Dieser Fall zeigt, welche prinzipielle Bedeutung die Kohlenhydratphosphorsäuren im pflanzlichen Stoffwechsel[9]), speziell wohl für den Atmungsprozeß, haben können.

---

[1]) C. Neuberg und B. Brahn, diese Zeitschr. 5, 438, 1907.
[2]) H. Steudel, Zeitschr. f. phys. Chem. 48, 425, 1907.
[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 9, 557, 1908.
[4]) A. Harden und W. J. Young, Proc. Chem. Soc. 21, 189, 1905; 23, 65, 1907; 24, 117, 1908; Proc. Roy. Soc. 21, 528, 1909.
[5]) E. Buchner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 136, 1905; diese Zeitschr. 19, 191, 1909.
[6]) L. Iwanow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 281, 1907.
[7]) A. v. Lebedew, diese Zeitschr. 20, 114, 1909.
[8]) Vgl. A. Wohl, diese Zeitschr. 5, 44, 1907.
[9]) Vgl. C. Neuberg, diese Zeitschr. 24, 430, 1910.

Wie die Kohlenhydratphosphorsäuren sind auch die Schwefelsäureverbindungen der Zuckerarten von Wichtigkeit. Außer den von E. Baumann entdeckten gepaarten Schwefelsäuren, d. h. den Schwefelsäureestern aromatischer Hydroxylverbindungen, ist seit den Forschungen Schmiedebergs auch eine Kohlenhydratschwefelsäure bekannt, die im Knorpel vorhandene Chondroitinschwefelsäure. Allerdings ist die Konstitution der Chondroitinschwefelsäure noch nicht aufgeklärt, doch so viel ist sicher, daß in ihr der Schwefelsäureester einer stickstoffhaltigen, zur Kohlenhydratreihe zählenden Substanz vorliegt. Solche Kohlenhydratschwefelsäureester gehören nach den Untersuchungen von I. A. Mandel und P. A. Levene[1]) zu den normalen Bestandteilen zahlreicher Organe und Gewebssäfte. In der Leber, in den Leukocyten, in der Milchdrüse, in der Milz, in den Nieren, im Pankreas, im Mucin der Sehnen kommen Verbindungen vor, die Kohlenhydrate und gleichzeitig gepaarte Schwefelsäuren enthalten, wenn auch im einzelnen die Natur dieser Schwefelsäureester noch unsicher ist.[2]) Synthetische Versuche zu ihrer Darstellung sind deshalb auch noch nicht unternommen. (Schwefelsäureester liegen möglicherweise auch in den Glucosiden vom Typus der Myronsäure und des Sinalbins vor.)

Aus diesen Darlegungen geht hervor, daß die künstliche Verknüpfung von Phosphorsäure mit Kohlenhydraten sowie die Darstellung von Schwefelsäureestern der Zuckerarten eine wichtige Aufgabe ist.

Nur zwei Angaben liegen darüber vor, daß die künstliche Vereinigung von Zuckern mit Phosphorsäure versucht ist. Amato[3]) erhielt durch Erwärmen von Helicin, dem Salicylaldehydglucosid, mit Phosphoroxychlorür eine amorphe phosphorhaltige Säure, die nicht ganz rein gewonnen wurde. Ihrem Natriumsalz schrieb der Autor die Formel $C_6H_{11}O_9PNa_2$ zu, und Berthelot[4]) will durch direkte Einwirkung von Phosphorsäure auf Glucose eine Verknüpfung erzielt haben. Doch hat er wie über die meisten von ihm bearbeiteten Säure-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 386, 1905.

[2]) I. A. Mandel und C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 142, 1908.

[3]) Gazz. Chim. Ital. 1, 56, 1871.

[4]) Ann. d. Chim. et de Phys. III, 54, 81.

derivate von Kohlenhydraten keine näheren Angaben gemacht. Amato wie Berthelot haben in saurer Lösung gearbeitet, und es liegt auf der Hand, daß der von ihnen eingeschlagene Weg, selbst wenn ihre Angaben zutreffend sind,[1]) bei empfindlichen Zuckerarten nicht zum Ziele führen kann. Disaccharide oder Zucker der 5-Kohlenstoffreihe werden beim Erwärmen mit Säuren hydrolysiert bzw. in Furfurol umgewandelt. Eine Synthese, die allgemeinerer Anwendung fähig sein soll, muß diese Punkte berücksichtigen, d. h., sie muß für Aldosen oder Ketosen in neutraler, bei nicht reduzierenden, aber leicht spaltbaren Zuckern vom Typus der Saccharose auch in alkalischer Lösung verlaufen. Diese Forderung wird erfüllt, wenn man Phosphoroxychlorid oder Phosphorpentachlorid bei Gegenwart säurebindender Mittel auf wässerige Zuckerlösungen einwirken läßt. Als Polyhydroxylverbindungen sind die Kohlenhydrate an sich befähigt, mehrere Säureradikale aufzunehmen. Um jedoch die Verhältnisse nicht zu komplizieren, ist die Reaktion so geleitet worden, daß sie zur Bildung eines Monophosphorsäureesters führt, d. h., es kam das Phosphoroxychlorid stets auf einen Überschuß von Zucker zur Anwendung. Wie erwähnt, ist die Anwesenheit säurebindender Stoffe notwendig. Als solche kommen bei Zuckern, die keine freie Carbonylgruppe enthalten, Laugen oder Erdalkalien in Betracht. Bei den reduzierenden Zuckern empfiehlt sich die Benutzung von Erdalkalicarbonaten bzw. von unlöslichen Metalloxyden (Magnesia, Aluminumhydroxyd oder Zinkoxyd). Da bei der Reaktion an sich freie Salzsäure entsteht, und ein Teil des Phosphoroxy-

[1]) Die in der Literatur vorhandene Notiz, daß Glucophosphorsäure von Levene in der Natur aufgefunden sei, beruht auf einer Täuschung durch den Namen. Die Glucophosphoric acid genannte Substanz (Journ. of the Americ. Chem. Soc. 24, 190, 1902) enthielt als Kupfersalz 2,41% N und 57,67% Asche. In einer späteren Mitteilung über denselben Gegenstand (Amer. Journ. of Physiol. 8, 11, 1903) teilte der Autor mit, daß die Verbindung 1,8% N und 50% Asche aufweist und ihr Kohlenhydrat Pentose (nicht Glucose) sei. Levene gibt ferner an, daß es sich um die von Palladin entdeckte und von Schulze und Winterstein untersuchte Substanz handle; letztere ist aber als Inositphosphorsäure von Neuberg (diese Zeitschr. 5, 443, 1907; 9, 557, 1908; 16, 406, 1909) sowie von Winterstein (Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 118, 1908) erkannt, hat also nichts mit Glucose zu tun.

chlorids sich mit Wasser zu Phosphorsäure und Chlorwasserstoff umsetzt, so ist auf die leichte Entfernbarkeit dieser Nebenprodukte Rücksicht zu nehmen. In praxi hat sich die Verwendung von Ätzkalk bzw. Calciumcarbonat am meisten bewährt. Hierbei wird auftretende anorganische Phosphorsäure in unlösliches Calciumphosphat verwandelt. Die Salzsäure gibt Calciumchlorid, das durch seine Löslichkeit in Alkohol von dem darin unlöslichen Kalksalz der Kohlenhydratphosphorsäure getrennt werden kann. Die Umsetzung[1]) vollzieht sich dann z. B. für Glucose im Sinne der Gleichung:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,POCl_3 + 5\,CaCO_3 = 5\,CO_2 + 3\,CaCl_2 + H_2O + 2\,C_6H_{11}O_5.O.PO_3Ca,$$

und für Rohrzucker:

$$2\,C_{12}H_{22}O_{11} + 2\,POCl_3 + 5\,CaO = 3\,CaCl_2 + H_2O + 2\,C_{12}H_{21}O_{10}.O.PO_3Ca.$$

Damit ist eine sehr einfache und im Prinzip vielseitiger Anwendung fähige Synthese von Kohlenhydratphosphorsäuren gegeben. Auch in andere Polyhydroxylkörper, wie Glycerin, Inosit usw., läßt sich nach diesem Verfahren Phosphorsäure einführen, ebenso in Oxysäuren. Inzwischen ist Fructose- und Galaktosephosphorsäure von Herrn cand. phil. Kretschmer dargestellt worden.

Vor Jahren hat E. Baumann[2]) gezeigt, daß man Ätherschwefelsäuren durch Einwirkung von Kaliumpyrosulfat auf Alkaliphenolate darstellen kann. Es lag nahe, die Gewinnung von Phosphorsäureestern nicht reduzierender Kohlenhydrate auf ähnlichem Wege mit Hilfe der Alkalipyrophosphate zu ver-

[1]) Die Phosphorylierung des Rohrzuckers geht so leicht vor sich, daß sie als Vorlesungsexperiment gezeigt werden kann. Man löst 3,6 g Rohrzucker in 30 ccm Wasser, setzt 8 ccm Natronlauge von 33% hinzu und schüttelt unter Zugabe einiger Eisstückchen mit einer Mischung von 1 ccm (= 1,69 g) Phosphoroxychlorid + 5 ccm Chloroform, die man allmählich hinzufügt. Wenn man nach einigen Minuten die von der Chloroformschicht abgehobene alkalische Flüssigkeit mit Essigsäure abstumpft, und mit überschüssiger Magnesiamixtur ausfällt, so kann man im Filtrat nach Soda-Salpeterschmelze oder nach dem Einkochen mit starker Salpetersäure wiederum Phosphorsäure, die in organischer Bindung vorhanden war, nachweisen. Durch einen blinden Versuch, Schütteln von Phosphoroxychlorid allein mit Lauge oder Ätzkalklösung, kann man zeigen, daß nur gewöhnliche Phosphate, aber keine, etwa von Magnesiamixtur nicht fällbaren Polyphosphorsäuren entstehen.

[2]) E. Baumann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 9, 1716, 1876.

suchen. Allein das Kaliumpyrophosphat besitzt nicht eine solche Reaktionsfähigkeit. Es liefert vielmehr bei der Umsetzung mit Saccharaten einfach die Salze der gewöhnlichen Phosphorsäure.

Dagegen gelingt es leicht, **Kohlenhydratschwefelsäureester durch Einwirkung von Kaliumpyrosulfat auf alkalische Zuckerlösungen darzustellen.** Die Methode ist selbstverständlich nur bei Zuckern anwendbar, deren reaktionsfähige Aldehyd- oder Ketogruppe verstopft ist. Bei Aldosen gelingt die Einführung von Schwefelsäuren analog der Darstellung von Glucosephosphorsäure durch Einwirkung von Sulfurylchlorid oder Chlorsulfonsäure bei Gegenwart von kohlensaurem Barium oder Calcium. Diese Bildung von Kohlenhydratschwefelsäureestern wurde konstatiert, aber bisher nicht weiter verfolgt.

Schwefelsäureester der Glucose sind schon auf anderem Wege erhalten. So soll nach alten Angaben von Péligot[1]) eine Tetraglucosemonosulfosäure der Formel $(C_6H_{12}O_6)_4SO_3$ beim Lösen von Traubenzucker in kalter konzentrierter Schwefelsäure entstehen, beim Verdünnen mit Wasser jedoch zum Teil wieder zerfallen. Nach Hönig und Schubert[2]) liegt hier überhaupt kein einheitliches Produkt vor, sondern es handelt sich um Kondensationsprodukte (Reversionsprodukte), die unter der wasserabspaltenden Wirkung der Schwefelsäure entstanden sind. Glucosetetrasulfosäure der Formel $C_6H_8O_6(HSO_3)_4$ soll nach Claësson[3]) als Chlorid beim Stehen einer Lösung von Traubenzucker in Chlorsulfonsäure sich bilden. Die aus dem Chlorid erhaltene freie Säure ist sehr unbeständig, und selbst ihr Bariumsalz schwärzt sich bei kurzem Aufbewahren. Bei partieller Hydrolyse soll sie in Glucosetrisulfosäure übergehen, die beständiger zu sein scheint.

Es ist klar, daß diese Methoden auf empfindliche Zucker oder Disaccharide nicht anwendbar sind. Die Isolierung der Kohlenhydratschwefelsäureester aus dem Reaktionsgemisch von Zucker, Kaliumpyrosulfat und Lauge gründet man zweckmäßig auf die Fällbarkeit durch Bleiessig und Ammoniak. Zu diesem Zwecke ist die Lösung zunächst zu neutralisieren, durch Bariumsalz von anorganischen Sulfaten zu befreien und dann mit Bleisubacetat und Ammoniak auszufällen. Der Niederschlag, der das basische Bleisalz der Kohlenhydratschwefelsäure

[1]) Annal. de Chim. et de Phys. II, 67, 108.

[2]) Wiener Monatsh. 7, 474.

[3]) Journ. f. prakt. Chem. II, 20, 1.

enthält, schließt auch Bleiverbindungen des unveränderten Zuckers ein. Er wird mit Schwefelwasserstoff bei Gegenwart von Calcium- oder Bariumcarbonat zersetzt; aus dem eingeengten Filtrat vom Schwefelblei und unveränderten Erdalkalicarbonaten fällt Alkohol das Barium- bzw. Calciumsalz der Kohlenhydratschwefelsäure, das durch mehrmaliges Lösen in Wasser und erneute Fällung mit Alkohol von anhaftendem Zucker getrennt und rein erhalten wird. Bei der Saccharose verläuft die Reaktion nach dem Schema

$$C_{12}H_{22}O_{11} + K_2S_2O_7 + KOH = H_2O + K_2SO_4 + C_{12}H_{21}O_{10}.O.SO_3K.$$

Die schließlich erhaltenen Barium- und Calciumsalze sind Halbsaccharate der wahrscheinlichen Formel:

$$C_{12}H_{20}O_{10}.O.SO_3\text{—}Ba\text{—} \quad \text{bzw.} \quad C_{12}H_{20}O_{10}.O.SO_3\text{—}Ca\text{—}$$

Eine solche Zusammensetzung, d. h. Salzbildung gleichzeitig an einem alkoholischen Hydroxyl und an der eigentlichen sauren Gruppe, ist vielfach beobachtet, beispielsweise bei den komplexen Salzen der Weinsäure, bei der Chondroitinschwefelsäure[1]), beim Isoserin[2]), bei der α-Oxy-β-aminobuttersäure[3]) bei den α- und β-2-Aminoglucoheptonsäuren[4]), bei der Cysteinsäure[5]) u. a.

Die Leichtigkeit, mit der Schwefelsäure in Form von Pyrosulfaten Kohlenhydratschwefelsäureester bildet, ist sehr bemerkenswert.

Der Eintritt von Phosphorsäure bzw. Schwefelsäure ins Molekühl der Kohlenhydrate hat eine auffallende Änderung des biologischen Charakters dieser Verbindungen zur Folge. So ist beispielsweise bei der Saccharosephosphorsäure wie bei der Glucosephosphorsäure die Gärfähigkeit verschwunden. Erst nach vorangegangener Abspaltung der Phosphorsäure durch chemische Mittel sind diese Verbindungen durch Hefe angreifbar. Obgleich die Phosphorsäure, wie vorher erwähnt, als Koenzym der Zymase fungiert, ist der fertige Phosphorsäure-

---

[1]) O. Schmiedeberg, Arch. f. experim. Pathol. 28, 355, 1891.

[2]) E. Fischer und H. Leuchs, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 3787, 1902.

[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 1, 282, 1906.

[4]) C. Neuberg und H. Wolff, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 4012, 1902 und 36, 618, 1903.

[5]) E. Friedmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 1, 1903.

ester an sich gärungsunfähig. Das steht im Einklange mit den Befunden von Harden und Young[1]), die eine Hexosephosphorsäureverbindung gerade am Ende der Zymaseeinwirkung nachwiesen. Andrerseits ist natürlich zu bedenken, daß die intermediär am Gärungsvorgang beteiligte Phosphorsäure mit anderen Hydroxylgruppen vorübergehend verestert sein kann.

Die Saccharoseschwefelsäure zeigt ein etwas anderes Verhalten gegen Hefe. Sie entwickelt langsam Kohlensäure, aber noch vor Ablauf der Gärung ist ein, wenn auch schwaches Reduktionsvermögen, aber noch keine anorganische H_2SO_4 vorhanden, was auf eine Invertasespaltung schließen läßt. Nebenher ist öfter eine Beteiligung auch des Schwefelsäurerestes am Stoffwechsel der Hefe zu beobachten. Das Gärgut riecht dann deutlich nach Schwefelwasserstoff; es scheint dabei auch Thiosulfat zu entstehen.

Experimenteller Teil.

Saccharosephosphorsäure.

Unsere frühere Beschreibung des Rohrzuckerphosphorsäureesters können wir durch folgende Angaben ergänzen.

Die Lösung des Calciumsaccharophosphates ist optisch aktiv, und zwar beträgt die spezifische Drehung:

$$[\alpha]_{D26} + 42{,}91^0.$$

($l = 2$; $\alpha = + 7{,}98^0$; Gewicht von 0,9299 g Substanz in 10,0 ccm Flüssigkeit 10,4405 g.)

Versetzt man die Lösung von 0,4650 g Substanz in 5 ccm Wasser mit der zur Bindung des Calciums notwendigen Menge 2-n-Salzsäure und füllt mit Wasser auf 10 ccm auf, so beobachtet man eine Anfangsdrehung im 2-Dezimeterrohre von $+ 3{,}74^0$; nach 20 Stunden ist dieselbe auf $+ 3{,}57^0$ gesunken. Gleichzeitig hat die Flüssigkeit Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Mischung erlangt. Daraus folgt, daß sich die freie Saccharosephosphorsäure zersetzt, wobei gleichzeitig eine Hydrolyse des Rohrzuckerrestes eintritt. Zu demselben Resultat führt der Versuch, durch Ausfällung des Calciums mit der äquivalenten Menge Oxalsäure in der Kälte die freie Säure darzustellen.

---

[1]) l. c.

Beim Eindampfen im Vakuum hinterbleibt hierbei ein zähflüssiger saurer Sirup, der durch absoluten Alkohol und Eisessig flockig gefällt wird. Allein auch diese Substanz ist nicht rein, denn sie reduziert deutlich Fehlingsche Lösung. Demnach muß die freie Saccharosephosphorsäure als zersetzlich gelten.

Wie schon früher angegeben, hebt der Eintritt der Phosphorsäure in das Molekül des Rohrzuckers die Gärfähigkeit völlig auf. Daß nicht etwa der Calciumgehalt des saccharosephosphorsauren Kalkes die Einwirkung der Hefe verhindert, ergibt sich ohne weiteres aus der Tatsache, daß nach Zusatz von ein wenig Rohrzucker dieser glatt vergärt. Wird der Phosphorsäureester vorher mit Salzsäure gespalten und die Lösung mit Soda neutralisiert, so tritt nunmehr Gärung ein.

Nimmt man die Hydrolyse des Calciumsaccharophosphates statt mit Säuren mit Alkalien bei 100° oder mit Wasser unter Druck bei 160° vor, so wird Phosphorsäure abgespalten und unzersetzter Rohrzucker zurückgebildet.

0,2096 g saccharosephosphorsaures Calcium wurden mit 8 ccm gesättigtem, alkalifreiem Barytwasser im zugeschmolzenen Rohr 6 Stunden lang im siedenden Wasserbade erhitzt. Der Röhreninhalt war völlig farblos und enthielt einen dichten Niederschlag von Barium- bzw. Calciumphosphat. Derselbe wurde abfiltriert und über die Molybdänfällung in pyrophosphorsaure Magnesia verwandelt. Gewogen wurden 0,0439 g $Mg_2P_2O_7 = 98{,}3\%$ der Theorie.

0,2131 g der Substanz wurden mit 10 ccm Wasser im Schießrohr 17 Stunden auf 160° erhitzt. In der klaren Lösung schwammen gallertige Flocken von Calciumphosphat. Zur quantitativen Bestimmung wurde der gesamte Röhreninhalt mit Barytwasser gefällt und die Niederschläge der Phosphate abfiltriert. Die übliche Bestimmung lieferte 0,0267 g $Mg_2P_2O_7$ = 55,8% der Theorie.

In beiden Fällen wurde das Filtrat der Bariumniederschläge mit Schwefelsäure vom Baryt befreit, mit Soda gerade alkalisch gemacht und dann mit Milchsäure schwach angesäuert. Es bestand kein Reduktionsvermögen, aber mit Hefe trat prompt Gärung ein, wodurch das Vorliegen von Rohrzucker erwiesen ist.

Glucosephosphorsäure.

Nach der im allgemeinen Teil angestellten Überlegung mußte zur Phosphorylierung der Glucose, das für die Saccharose angewandte Verfahren insofern geändert werden, als die Umsetzung wegen der leicht angreifbaren Aldehydgruppe nur bei neutraler Reaktion verlaufen darf. An Stelle des Ätzkalks trat Calciumcarbonat.

In einer Lösung von 180 g reinem Traubenzucker in 3 bis 4 l Wasser wurden 500 g gefälltes Calciumcarbonat fein verteilt. Dieser gut in einer Kältemischung gekühlten Suspension wurden allmählich unter ständigem Schütteln auf der Maschine (Flasche mit Bunsenventil!) kleine Mengen mit Chloroform gemischten Phosphoroxychlorids hinzugefügt. Es traten im ganzen 154 g Phosphoroxychlorid, gelöst in etwa 500 ccm Chloroform, in Reaktion. Ein Zeichen, daß das in der Mischung befindliche Phosphoroxychlorid verbraucht war, ergab sich in dem Aufhören der Kohlensäureentwicklung. Es ist wegen der Empfindlichkeit der Glucosephosphorsäure für dauernd neutrale Reaktion Sorge zu tragen; die Mischung darf zu keiner Zeit Kongopapier bläuen. Das Schütteln nahm jedesmal 8 bis 10 Stunden in Anspruch, weil sich das in Chloroform gelöste Oxychlorid mit wässeriger Calciumcarbonatsuspension wesentlich langsamer umsetzt als mit Ätzkalklösung. In Fällen, in denen die Flüssigkeit sofort nach Beendigung des Schüttelns auf das Filter gebracht worden war, bestand am andern Morgen saure Reaktion, da sich in dem durchs Filter gegangenen Chloroform noch unzersetztes Phosphoroxychlorid befunden hatte. Deswegen darf die Mischung erst nach 12stündigem Stehen über dem Calciumcarbonatschlamm filtriert werden. Der Rückstand, der sich aus übrig gebliebenem Calciumcarbonat und Calciumphosphat zusammensetzt, muß mehrfach sorgfältig mit kaltem Wasser ausgewaschen werden. Das Filtrat wurde im Vakuum zwischen 35° und 40° eingeengt; hierbei schieden sich noch Calciumcarbonat und stets auch Phosphat ab. Die gesamte Flüssigkeitsmenge wurde auf ungefähr 1 l gebracht, klar filtriert und in die 4fache Menge Alkohol eingetropft, wobei das Calciumsalz des Glucosephosphorsäureesters ausfiel. Die Lösung des glucosephosphorsauren Calciums und des Calciumchlorids weiter

einzuengen, war nicht angängig, weil sich in stärkerer Konzentration beim Eintropfen in Alkohol größere Mengen des Calciumchlorids mit ausschieden und der ausfallenden Substanz eine schmierige bis ölige Konsistenz gaben. Um das Calciumglucophosphat von mitgerissenem Calciumchlorid zu reinigen, wurde der Niederschlag auf einer Nutsche abgesaugt, im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure von Alkohol befreit, in Wasser gelöst und wiederum mit Alkohol gefällt. Dieses Verfahren muß 4 bis 5mal bis zum Verschwinden der Chlorreaktion wiederholt werden. Die Analysen der so gereinigten Substanz ergaben folgende Werte:

0,3559 g Substanz gaben 0,2792 g CO_2, 0,1315 g H_2O;
0,2125 „ „ „ 0,1660 „ „ 0,0840 „ „ ;
0,2469 „ „ „ 0,0950 „ Asche;
0,3246 „ „ „ 0,0537 „ CaO, 0,1090 $Mg_2P_2O_7$;
0,4153 „ „ „ 0,0692 „ „ 0,1399 „ .

	Berechnet für $C_6H_{11}O_9PCa + 2H_2O$	Gefunden
$Ca_2P_2O_7$ =	38,02%	38,47%
Ca =	11,97%	11,83%, 11,92%
P =	9,28%	9,35%, 9,41%
C =	21,55%	21,40%, 21,31%
H =	4,49%	4,13%, 4,42%.

Eine direkte Wasserbestimmung war unmöglich, da das H_2O erst bei Temperaturen entweicht, wo die Substanz bereits unter Bräunung Phosphorsäure abspaltet.

Die Ausbeuten an Kalksalz der Glucosephosphorsäure sind geringer als bei der Rohrzuckerverbindung. Es liegt dies daran, daß die Phosphorylierung bei Gegenwart von Calciumcarbonat an sich schlechter verläuft als bei Anwesenheit von Ätzkalk. Hinzu kommt, daß beim Einengen selbst bei 40° aus der gepaarten Glucophosphorsäure dauernd Calciumphosphat wieder abgespalten wird, und schließlich hält die große Menge des entstandenen Chlorcalciums bei der Fällung mit Alkohol einen Teil des Calciumglucophosphates in Lösung.

Eine Vereinfachung der Darstellung durch Versuche, aus dem Filtrat die Hauptmenge des Chlors mit Bleiacetat und dann den Traubenzuckerphosphorsäureester mit Bleiessig und Ammoniak niederzuschlagen, scheitert an dem Umstande, daß dem ausgefallenen Chlorblei beträchtliche Mengen Glucophosphat

beigemischt sind, und anderseits daran, daß Chlor noch in Lösung bleibt.

Das Kalksalz des Glucosephosphorsäureesters ist ein weißes, luftbeständiges Pulver, das in Wasser löslich ist. Die Lösung des reinen Salzes gibt weder mit Bleizucker noch mit Bleiessig einen Niederschlag, wohl aber mit Bleiessig und Ammoniak.

An welcher Stelle die Phosphorsäure in das Traubenzuckermolekül eingetreten ist, läßt sich vorläufig so wenig wie bei der Saccharoseverbindung angeben; nur der Glucosidtypus läßt sich ausschließen, da die Verbindung glatt Fehlingsche Lösung reduziert.

Ebenso wie die Saccharosephosphorsäure gibt die Glucosephosphorsäure mit Magnesiamixtur und mit Ammoniummolybdat keine Reaktion, sondern es ist nötig, durch vorangehendes Kochen mit Mineralsäuren die Substanz zu spalten. Die Zerlegung tritt bei der Glucosephosphorsäure leichter ein. Während saccharophosphorsaurer Kalk gegen siedendes Wasser beständig ist und erst bei 160° unter Druck etwa zur Hälfte verseift wird, genügte es bei dem Calciumglucophosphat, mit Wasser im Einschlußrohr 4 Stunden lang im Dampfbade (auf 100°) zu erhitzen, um 87% der Verbindung zu spalten.

Es wurden 0,2154 g Substanz in 10 ccm Wasser gelöst und der beschriebenen Behandlung im Schießrohre unterworfen. Alsdann wurde die Flüssigkeit mit Barytwasser versetzt und sofort filtriert. Aus der Lösung des Rückstandes in verdünnter Salpetersäure wurde die Phosphorsäure mit Ammoniummolybdat gefällt und in bekannter Weise in Magnesiumpyrophosphat übergeführt.

Gewogen wurden 0,0597 g $Mg_2P_2O_7$; da 0,2154 g des Salzes 0,0684 g $Mg_2P_2O_7$ geben könnten, sind also 87,4% der in organischer Bindung vorhandenen Phosphorsäure abgespalten worden.

Das Filtrat der im Einschlußrohre erhitzten Lösung des Glucosephosphorsäureesters wurde in der Kälte mit Schwefelsäure vom Baryt befreit, die Säure mit Soda neutralisiert und alsdann wieder mit einem Tropfen Milchsäure angesäuert, um eine Gärungsprobe vornehmen zu können. Gleichzeitig wurde etwa 0,1 g des Esters mit Hefe, ein Röhrchen mit Wasser und Hefe zur Kontrolle und ein zweites mit Traubenzucker und Hefe angesetzt. Die Kontrollproben verliefen einwandsfrei; der unverseifte Ester gor nicht, während der gespaltene Kohlen-

säure lieferte. Es ergibt sich also einmal, daß bei der Verseifung von Calciumglucophosphat durch siedendes Wasser Traubenzucker zurückgebildet wird, und dann auch hier die Tatsache, daß die Einführung von Phosphorsäure in den Traubenzucker die Gärfähigkeit aufhebt. Daß nicht etwa die Anwesenheit von Calcium die Hefe in ihrer Wirkung behindert, ergibt sich aus der Versuchsanordnung, die bei den Gärungsproben des Saccharosephosphorsäureesters getroffen wurde.

Saccharoseschwefelsäure.

90,0 g Rohrzucker wurden zusammen mit 80 g Stangenkali und 200 ccm Wasser gelöst und auf dem Wasserbade auf eine Temperatur von 60 bis 70° gebracht. In diese Lösung wurden nach und nach in kleineren Portionen 64 g feingepulvertes Kaliumpyrosulfat gebracht. Das Eintragen dauert 8 Stunden, und vor jedem neuen Zusatz ist durch reichliches Schütteln für möglichste Lösung Sorge zu tragen. Man überläßt zum Schluß die Lösung 12 Stunden sich selbst, neutralisiert sie genau mit Essigsäure und fällt mit einer konzentrierten Lösung von Bariumacetat alle anorganische Schwefelsäure aus. (Man kann auch zuerst mit Barytwasser ausfällen und dann das alkalische Filtrat mit Essigsäure neutralisieren.) Der massige Bariumsulfatniederschlag muß sehr gut ausgewaschen und die infolgedessen stark verdünnte Flüssigkeit zunächst im Vakuum eingeengt werden. Bleiessig erzeugt nunmehr auf Zusatz von Ammoniak eine reichliche Fällung, die abfiltriert und bis zur neutralen Reaktion ausgewaschen wird. Der Bleiniederschlag wird dann mit Wasser angerieben und mit Schwefelwasserstoff bei Gegenwart von Bariumcarbonat vollständig zerlegt. Die filtrierte Lösung wurde im Vakuum eingeengt, klar filtriert und in Alkohol eingetropft. Der entstandene weiße, flockige Niederschlag wurde zur Entfernung anhaftenden Rohrzuckers, der ja auch durch Bleiessig und Ammoniak gefällt wird, mehrfach in Wasser gelöst und wieder mit Alkohol niedergeschlagen. Das erhaltene Bariumsaccharosulfat stellt ein durchaus luftbeständiges weißes Pulver dar, das leicht in Wasser löslich ist. Die wässerige Lösung gibt allein mit Bleiessig und Ammoniak eine Fällung. Die Substanz reduziert Fehlingsche Mischung nicht, wohl aber nach vorherigem Kochen mit Mineralsäuren.

0,1365 g Substanz gaben 0,0573 g Asche;
0,3417 g „ „ 0,3207 g CO_2, 0,1137 g H_2O;
0,2611 g „ „ 0,2461 g CO_2, 0,0879 g H_2O;
0,1756 g „ „ nach d. Aufschließ. 0,0728 g $BaSO_4$ (Ba-Bestimm.) u. 0,0727 g $BaSO_4$ (S-Bestimm.).

Berechnet für $C_{12}H_{20}O_{10}OSO_3$: (—Ba—)	Gefunden:
$BaSO_4 = 41{,}83\%$	$41{,}97\%$
$Ba = 24{,}55\%$	$24{,}40\%$
$S = 5{,}73\%$	$5{,}69\%$
$C = 25{,}85\%$	$25{,}59\%$; $25{,}71\%$
$H = 3{,}59\%$	$3{,}72\%$; $3{,}76\%$.

Das Salz wird, wie zuvor auseinandergesetzt, wohl am besten als Halbsaccharat aufgefaßt.

Die Ausbeute betrug etwa 15 g.

In der Saccharoseschwefelsäure haftet die Schwefelsäure sehr fest. Zu ihrem Nachweise ist Schmelzen mit Soda und Salpeter erforderlich oder mehrmaliges Eindampfen mit Königswasser bis fast zur Trockne. Hydrolyse tritt auch beim Kochen mit Salzsäure allein ein, doch scheiden sich hierbei Huminstoffe aus, und zwar in dunklen Flocken, welche die Erkennung des ausgefallenen Bariumsulfats erschweren. Auf Zusatz von Salpetersäure bleibt die Lösung dagegen farblos.

Das Bariumsaccharosulfat dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts.

$$[\alpha]_{D\,20} = +26{,}09^\circ.$$

($\alpha = +2{,}31^\circ$; $l = 2$; in 10,2117 g Lösung waren 0,4426 g Substanz.)

Auf Zugabe von so viel kalter Salzsäure zu der Bariumverbindung, daß gerade die freie Säure entsteht, erhält man eine Flüssigkeit, die bald Fehlingsche Lösung reduziert. Daraus ist zu entnehmen, daß die freie Saccharoseschwefelsäure zersetzlich ist.

Ganz entsprechend der beschriebenen Darstellung des Bariumsalzes erhält man das Calciumsaccharosulfat, wenn man die Zerlegung der rohen Bleiverbindung der Rohrzuckerschwefelsäure in Gegenwart von kohlensaurem Calcium (statt von $BaCO_3$) vor sich gehen läßt. Das Kalksalz bildet ebenfalls ein luftbeständiges weißes Pulver und zeigt sehr ähnliche Eigenschaften.

0,1881 g Substanz gaben 0,2130 g CO_2, 0,0725 g H_2O;
0,1616 g „ „ 0,1821 g CO_2, 0,0669 g H_2O;
0,1560 g „ „ 0,0472 g Asche;
0,3903 g „ „ 0,0464 g CaO, 0,1957 g $BaSO_4$;
0,2176 g „ „ —— 0,1089 g $BaSO_4$.

	Berechnet für $C_{12}H_{20}O_{10}OSO_3$: —Ca—	Gefunden:	
$CaSO_4$ =	29,56%	30,05%	
Ca =	8,69%	8,50%	
S =	6,95%	6,88%;	6,87%
C =	31,31%	30,88%;	30,73%
H =	4,35%	4,22%;	4,59%.

Die Lösungen von saccharoseschwefelsauren Salzen geben die Farbenreaktionen des Rohrzuckers.

Das Calciumsalz diente zu Versuchen über die Gärbarkeit der Saccharoseschwefelsäure. Eine Lösung von 0,3 g des Salzes in 10 ccm Wasser entwickelt innerhalb 24 Stunden mit Hefe deutlich Kohlensäure; allein die Menge des Kohlendioxyds ist sichtlich geringer als die in einer Kontrollprobe mit 0,1 g Rohrzucker. Eine vorher mit Salzsäure invertierte und neutralisierte Lösung des Calciumsaccharosulfats zeigt starke Gärung.

Bemerkenswert sind die Eigenschaften, die das Gärgut dieses durch Hefe nur zum Teil angegriffenen saccharoseschwefelsauren Calciums aufweist.

1. Die mit kolloidalem Ferrihydroxyd von Hefenpartikeln befreite[1]) Flüssigkeit reduziert schwach Fehlingsche Mischung; Schwefelsäure ist nicht abgespalten, ein großer Teil des Salzes ist noch unzerlegt und unvergoren (starke Zunahme des Reduktionsvermögens nach dem Kochen mit Mineralsäuren, positiver Ausfall der Reaktionen von Molisch und von Seliwanoff sowie allmähliche Abspaltung von H_2SO_4). 2. Es tritt manchmal unverkennbar der Geruch nach Schwefelwasserstoff auf; säuert man die klare Lösung mit verdünnter Salzsäure an, so bleibt sie durchsichtig, beim Kochen erfolgt jedoch nach kurzer Zeit eine allmählich stärker werdende Abscheidung von kolloidalem Schwefel; man wird am ehesten an Thiosulfat als dessen Muttersubstanz zu denken haben. Beim Kochen mit alkalischer Bleilösung stellt sich Schwärzung ein, das Schwefelblei haftet an dem gleichzeitig entstehenden farblosen Niederschlag von Phosphaten und Gips.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 24, 424 und 431, 1910.

Über die Phosphorylierung von Eiweiß und die Bindung des Phosphors in den natürlichen Phosphorproteinen.

Von

C. Neuberg und H. Pollak.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

Die Verbindungen von Kohlenhydraten mit Phosphorsäure sind unzweifelhaft als Ester aufzufassen.[1]) Dagegen liegen über die Form der Verknüpfung des Phosphors in den Phosphorproteinen bisher keine entscheidenden Angaben vor. Sicher ist, daß der Phosphor in diesen Verbindungen als ein Derivat der Phosphorsäure enthalten ist, denn die Totalhydrolyse durch Säuren oder Alkalien liefert gewöhnliche H_3PO_4, und zu dem gleichen Ergebnis führt die Einwirkung von Verdauungsenzymen.[2]) Da es sich jedoch unzweifelhaft nicht um phosphorsaure Salze, um Eiweißphosphate, handelt, kommen vornehmlich zwei Möglichkeiten in Betracht.

1. Entweder ist die Phosphorsäure esterartig mit Hydroxylgruppen bestimmter Eiweißbausteine verknüpft. Solche hydroxylierten Aminosäuren liegen im Tyrosin, dann in den eigentlichen Oxyaminosäuren, wie Serin, Oxypyrrolidincarbonsäure und Diaminotrioxydodecansäure, vor.

Oder 2. die Phosphorsäure tritt mit Amino- bzw. Iminogruppen des Eiweißes zu säureamidähnlichen Verbindungen, zu Substitutionsprodukten der Phosphaminsäure $NH_2.PO(OH)_2$ bzw. des Phosphamids $OP(NH_2)_3$ oder analoger Aminophosphorsäureverbindungen, zusammen. Eine Entscheidung zwischen beiden Verknüpfungsmöglichkeiten ist, wie bemerkt, bisher nicht getroffen.

---

[1]) Siehe C. Neuberg und H. Pollak, diese Zeitschr. 23, 515, 1910 und 26, 514, 1910.

[2]) Siehe bei R. H. Aders und W. M. Bayliss, Journ. of Physiol. 33, 439, 1906.

Die Tatsache, daß die für die Ernährung des jugendlichen Organismus wichtigsten Nährstoffe phosphorhaltig sind, wie das Casein der Milch, das Vitellin des Eidotters und die Phytoglobuline in den Reservestoffen der Pflanzensamen, zeigt ohne weiteres die hohe Bedeutung der Phosphoreiweißverbindungen; sind sie es doch, die zur ersten Bildung des Knochengerüstes, der Nucleinsäuren, der phosphorhaltigen Zellglobuline und der Phosphatide beitragen.

Sowohl hinsichtlich der Auffassung der natürlichen Phosphorproteine wie in mancher anderen Hinsicht bietet eine künstliche Verknüpfung von Phosphorsäure mit Aminosäuren bzw. mit Eiweißstoffen ein Interesse.

Es gestaltet sich jedoch die Einführung von anorganischen Säureresten, speziell von Phosphorsäure, hier schwieriger als bei den Zuckern.

Behandelt man unter Eiskühlung die Lösungen einfacher Aminosäuren, z. B. von Glykokoll, Alanin, Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure, Serin, Diaminopropionsäure, mit Phosphoroxychlorid (in Chloroformlösung) bei Gegenwart von Laugen, Erdalkalien oder besser Erdalkalicarbonaten, so läßt sich auch hier mit Leichtigkeit die Entstehung einer organischen Phosphorsäureverbindung dartun. Denn entfernt man die anorganischen Phosphate mit Magnesiamixtur, so findet sich in der Lösung noch Phosphor, der erst nach der Veraschung nachweisbar wird. Allein die Isolierung der Aminosäuren-Phosphorsäureverbindungen in völlig reinem Zustande ist bisher nicht gelungen. Unter den Bedingungen, die eine Abscheidung der anorganischen Phosphorsäure ermöglichen, z. B. Ausfällung mit Barytsalzen, wird auch aus der gepaarten Verbindung Phosphorsäure zum Teil wieder abgespalten, und die völlige Trennung von unveränderter Aminosäure und phosphoryliertem Produkt ist gleichfalls bislang nicht möglich gewesen. Dieses Verhalten, insbesondere die lockere Verbindung der Phosphorsäure, erinnert weitgehend an die entsprechenden Eigenschaften der durch Fermenthydrolyse aus den natürlichen Phosphorproteinen erhaltenen phosphorhaltigen Proteosen. Die phosphorhaltigen Caseinalbumosen, deren bestbekannter Vertreter die Paranucleinsäure von E. Salkowski[1]) ist, sowie die nahe ver-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 297, 1899; 32, 245, 1901.

wandten Substanzen von A. Reh[1]) spalten auch leicht Phosphorsäure ab; die Bindung der Phosphorsäure scheint noch lockerer zu sein, wenn man den Abbau über die Albumosenstufe hinaus ausdehnt, indem bisher phosphorhaltige niedere Aminosäurenverbände[2]) bei der Hydrolyse nicht isolierbar gewesen sind.

Dagegen scheint sich mit zunehmender Molekulargröße, z. B. bei den Proteinen selbst, auch die Haftfestigkeit der Phosphorsäure zu erhöhen. Aus diesem Grunde haben sich die erwähnten Schwierigkeiten der Isolierung umgehen lassen, wenn man die Reaktion mit phosphorsäurefreien Eiweißkörpern, z. B. mit Blutglobulin oder Lactalbumin, vornimmt. Dann erhält man ohne weiteres phosphorylierte Produkte, für die man einen ähnlichen Bau annehmen muß, wie für die natürlichen Phosphorproteine zuvor ausgeführt worden ist.

Allem Anscheine nach ist die Zahl der Amid- bzw. Imidgruppen im Eiweiß größer als die der OH-Reste, und da auch hydroxylfreie Aminosäuren (s. o.) phosphorylierbar sind, dürfte die Auffassung der natürlichen Posphorproteine als Abkömmlinge einer Phosphaminsäure[3]) den Tatsachen am meisten entsprechen.

Die Isolierung der künstlichen Phosphoreiweißverbindungen wird durch den Umstand erleichtert, daß man aus mit Phosphoroxychlorid unter Kühlung behandelten Eiweißlösungen die Phosphorylierungsprodukte durch Ansäuern mit Essigsäure usw. zur Abscheidung bringen kann, wobei natürlich die Alkaliphosphate in Lösung bleiben.

Durch einen besonderen Versuch haben wir uns überzeugt, daß bei der Ausfällung von Eiweiß aus alkalischer Lösung durch Essigsäure bei Gegenwart von Alkaliphosphaten keine phosphorhaltigen Niederschläge, keine Proteinphosphate, entstehen. Auch hiervon abgesehen, zeigen die mit Phosphoroxychlorid erhaltenen Verbindungen durchaus den Charakter von substituierten Phosphaminsäuren, nicht von phosphorsauren Salzen.

Die künstlichen Phosphoreiweißverbindungen ähneln den natürlichen Phosphorproteinen in der Zusammensetzung und im Verhalten, auch insofern als sie durch peptisches und tryptisches Ferment verdaut werden.

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 1, 1901.

[2]) Versuche hierüber sind im Gange.

[3]) Eine analoge Konstitution dürfte für bestimmte Aminophosphatide in Betracht zu ziehen sein.

Experimentelles.

Wie eingangs erwähnt, hat die Phosphorylierung der Aminosäuren bisher nicht zu ganz reinen Substanzen geführt. Deshalb sei lediglich die Einführung von Phosphorsäure in native Eiweißkörper beschrieben.

Die Einwirkung von Phosphoroxychlorid auf Eiereiweiß hat vor Jahren bereits Bechhold[1]) studiert. Er hat jedoch ohne Kühlung und mit unverdünntem Halogenphosphor gearbeitet. Dabei findet nach des Autors Angaben beträchtliche Erhitzung statt, und es kommt zur Spaltung sowie Schwefelwasserstoffentwicklung, d. h. zu partieller Zersetzung des Eiereiweißes.

Benutzt haben wir: Lactalbumin sowie Blutglobulin, bei denen die Reaktion in gleicher Weise verlief. Erfahrungsgemäß haftet den natürlichen Proteinen häufig Calciumphosphat an. Die angewandten Eiweißkörper waren in bekannter Weise derart gereinigt, daß sie nicht mehr als Spuren von Phosphor enthielten, insbesondere gaben 4,0 g des Lactalbumins nach der Schmelze mit Soda-Salpeter mit Ammoniummolybdat in salpetersaurer Lösung nur eine Gelbfärbung, aber keine Fällung.

7,5 g staubfeines Lactalbumin wurden in 100 ccm Wasser suspendiert und in kleinen Portionen mit so viel einer Lösung von 16,8 g Ätzkali in 300 ccm Wasser versetzt, daß bei heftigem Schütteln, ev. unter gelindem Erwärmen auf 30°, so schnell als möglich Lösung eintrat. Zu der in einer Kältemischung dann stark gekühlten Flüssigkeit wurde unter stetem Schütteln allmählich eine Mischung von 16 g Phosphoroxychlorid in 80 ccm Chloroform[2]) getropft und dabei nach und nach der Rest der genannten Lauge sowie weitere 16,8 g Kaliumhydroxyd in 100 ccm Wasser hinzugefügt. Die Prozedur erfordert etwa 4 bis 6 Stunden. Dann wird das Chloroform im Scheidetrichter abgelassen und aus der klar filtrierten Lösung sofort durch Zusatz von Essigsäure bis zur gerade deutlichen sauren Reaktion das phosphorylierte Produkt gefällt. Die Abscheidung kann durch Eintragen von Kochsalz

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 122, 1901.

[2]) Die Eiweiß fällende Wirkung des Chloroforms (E. Salkowski, Deutsch. med. Wochenschr. 1888, Nr. 16; Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 329, 1900) kommt in den alkalischen Lösungen nicht zur Geltung.

oder von Ammoniumsulfat vervollständigt werden. Auch kurzes Erwärmen auf dem Wasserbade ist empfehlenswert.

Die in weißen Flocken ausgefallene Substanz wird abfiltriert, auf dem Filter mit Wasser bis zum Verschwinden der Reaktionen auf Phosphorsäure und Chlor ausgewaschen und dann mit Alkohol und Äther behandelt. Es resultiert ein weißes Pulver, das nach dem Trocknen schwach gelb erscheint.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 105° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Präparat I.

0,4796 g Substanz ergaben (nach Kjeldahl) 0,0740 g N.
1,4066 g Substanz ergaben 0,0634 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0176 g P).

Präparat II.

0,4971 g Substanz ergaben (nach Kjeldahl): 0,0783 g N,
0,1803 g „ „ (nach Dumas): 24,6 ccm N, bei 18°, 757 mm (= 0,0283 g N);
0,1212 g „ „ 0,2333 g CO_2, 0,0774 g H_2O;
1,5115 g „ „ 0,0694 g $Mg_2P_2O_7$ (= 0,0193 g P);
1,2132 g „ „ 0,0688 g $BaSO_4$ (= 0,00945 g S).

C = 52,49; H = 7,09; N = 15,51; P = 1,25; S = 0,78%;
N = 15,75; P = 1,28;
N = 15,69.

Die Ausbeute betrug 3,7 g.

Es läßt sich natürlich nicht ohne weiteres behaupten, daß die phosphorylierte Verbindung frei vom Ausgangsmaterial ist. Sie verändert jedoch durch Umfällen aus Kalilauge mit Essigsäure ihre Zusammensetzung nicht. Im Gegensatz zum Lactalbumin hat das phosphorylierte Produkt wie die natürlichen Nucleoalbumine deutlich saure Eigenschaften. Beachtenswert ist, daß die elementare Zusammensetzung des wichtigsten Phosphorproteins, des Caseins (C = 52,96, H = 7,05, N = 15,65, P = 0,85, S = 0,76%, nach Hammarsten[1]) sehr ähnlich ist.

Ausgehend von dem Gedanken, daß Veränderungen im Ausfall der bekannten Eiweißreaktionen einen Anhalt für den Ort des Phosphorsäureeintritts abgeben könnten, haben wir das Verhalten des phosphorylierten Lactalbumins nach dieser Richtung geprüft. Die Biuret-, Xanthoprotein-, Schwefel-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 227, 1883; 9, 273, 1885.

bleiprobe, die Reaktionen nach Millon, Liebermann sowie Hopkins und Cole traten jedoch durchaus in der gewöhnlichen Weise ein.

Die Verdaubarkeit durch tryptisches Ferment ist durch die Phosphorylierung nicht aufgehoben. 1,0 g der feingepulverten Substanz, die unter Zusatz von 1 Tropfen verdünnten Ammoniaks und von Chloroform in 15 ccm Wasser suspendiert war, wurde bei 38° durch Pankreatin (Rhenania) in 24 Stunden völlig gelöst; nach dieser Zeit ist auch die Abspaltung von anorganischer Phosphorsäure schon recht deutlich. Ob es sich hierbei einfach um die Wirkung des Trypsins oder einer besonderen Phosphaminase handelt, ist vorläufig unentschieden.

Anders verläuft die peptische Verdauung. Aus E. Salkowskis (l. c.) Arbeiten mit Casein geht hervor, daß je nach dem Zeitpunkte, wo man die Einwirkung des Magensaftes unterbricht, phosphorhaltige oder phosphorfreie Albumosen entstehen. Ganz ebenso verhält sich das künstlich phosphorylierte Lactalbumin.

Digeriert man 3 g des Produktes mit 100 ccm kräftiger Pepsinsalzsäure, so ist nach 48stündigem Stehen bei 38° fast alles gelöst. In dem klar filtrierten Verdauungsgemische ist keine anorganische Phosphorsäure vorhanden. Stumpft man die salzsaure Reaktion mit Soda ab, so erhält man durch Ferriammonsulfat bei gelindem Erwärmen einen reichlichen Niederschlag der Eisenverbindung einer P-haltigen Albumose, die der Paranucleinsäure Salkowskis aus Casein sehr ähnlich ist. Auch Uranylacetat erzeugt eine Fällung, die das Salz einer organischen Phosphorsäureverbindung ist.

Dehnt man die Pepsinverdauung auf 4 bis 8 Tage aus, so ist abgespaltene Orthophosphorsäure deutlich nachweisbar.

Durch Erwärmen mit Lauge wird ebenfalls Phosphorsäure losgelöst. Dagegen gibt die phosphorylierte Substanz an siedendes Wasser keine Spur H_3PO_4 ab. Dadurch unterscheidet sie sich scharf von den (durch Metaphosphorsäure entstehenden) Eiweißphosphaten, die nach E. Fuld[1]) zum charakteristischen Unterschied von Casein beim Kochen mit Wasser alle Phosphorsäure verlieren und sie bei kurzdauernder Pepsinverdauung sofort als Orthophosphorsäure abspalten.

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 155, 1902.

Berichtigung zu der Arbeit:

Über das Verhalten der Sperma- und Eienzyme bei der Befruchtung und ersten Entwicklung.

Von

Martin Jacoby.

(Bd. 26, Heft 3 u. 4.)

S. 340 Zeile 6 von oben und S. 343 Zeile 2 von oben muß es statt „Vierzellenstadium“ lauten: Vielzellenstadium.

PERIODICAL

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

RENEWED BOOKS ARE SUBJECT TO
IMMEDIATE RECALL

UCD LIBRARY

DUE JUL 31 1981

JUL 24 1981 REC'D

Library, University of California, Davis

Series 458A

61877 QP501
Biochemische zeitschrift. B54
v.26
75 00711 0045
Biochemische zeitschrift
QP501
B54
v.26

A...
S. 37
Ascoli, ... alimentäre ... Acetonurie. ...
Bacmeister. Unte... Cholesterinausscheidu... lichen Gallen. S. 223.
Bang, Ivar. Untersuchungen ü... die Guanylsäure. S. 293.
Baum, Fritz. Über eine einfache Darstellung von reinem Cyanamid. S. 325.
Buchner, Eduard und Hugo Haehn. Über eine Antiprotease im Hefepreßsaft. S. 171.
Charnass, D. siehe v. Fürth und Charnass.
Cohn, M. siehe Liefmann und Cohn.
Fränkel, Sigmund. Über Lipoide. X. S. 41.
— — Desgl. XI. S. 44.
— — Desgl. XII. S. 53.
Freund, Ernst und Gisa Kaminer. Über die Beziehungen zwischen Tumorzellen und Blutserum. S. 312.
Friedmann, M. siehe v. Fürth und Friedmann.
Fürth, O. v. und D. Charnass. Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittlung der daraus abspaltbaren Aldehydmenge. S. 199.
— und M. Friedmann. Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente. S. 435.
— und Emil Lenk. Über einige Versuche zum Abbaue der Cholsäure. II. S. 406.
Jacob... munisatorisch... Entwicklung anrege... substanzen. S. 333.
— Über das Verhalten der Sperma- und Eienzyme bei der Befruchtung und ersten Entwicklung. S. 336 u. 536.
Kaminer, Gisa siehe Freund und Kaminer.
Kondo, Kura. Zur Kenntnis d. Chondroitinschwefelsäure. S. 116.
Kondo, Kenro. Zur Kenntnis der in Essigäther löslichen Stoffe tierischer Organe und ihres Verhaltens bei der Autolyse. I. S. 238.
— — Desgl. II. S. 243.
— — Desgl. III. S. 252.
Lebedew, A. v. Bemerkungen zu den „Studien über Kataphorese von Fermenten und Kolloiden“ von H. Iscovesco. S. 221.
Lenk, Emil siehe v. Fürth und Lenk.
Liefmann, H. und M. Cohn. Beiträge zur Hämolyse durch Lipoide. S. 85.
Loeb, Jacques. Über die Hemmung der Giftwirkung von Hydroxylionen auf das Seeigelei mittels Cyankalium. S. 279.

PERIODICAL

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

RENEWED BOOKS ARE SUBJECT TO
IMMEDIATE RECALL

UCD LIBRARY

DUE JUL 31 1981

JUL 24 1981 REC'D

...für

...kens und

...naur u. Hans
...ber. Der Grund-
...d Nahrungsbedarf des
...gs gemäß Untersuchungen
...e Gasstoffwechsels. S. 14.
Stanewitsch, E. siehe Palladin und Stanewitsch.
Stauber, A. siehe Glaeßner und Stauber.
Trunkel, Hans. Über Leim und Tannin. S. 458.
— — Über das optische Drehungsvermögen des Leims. S. 493.
Wolf, C. G. L. und Mc Kim Marriot. Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff im Blut. S. 165.

...Über Phos-
... Schwefelsäure-
...von Kohlenhydraten. S. 514.
— — Über die Phosphorylierung von Eiweiß und die Bindung d. Phosphors in den natürlichen Phosphorproteinen. S. 529.
Palladin, W. und E. Stanewitsch. Die Abhängigkeit der

61877 QP501
Biochemische zeitschrift. B54
v.26

75 00711 0045

Biochemische zeitschrift
QP501
B54
v.26

PERIODICAL
61877

PERIODICAL

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

RENEWED BOOKS ARE SUBJECT TO
IMMEDIATE RECALL

UCD LIBRARY

DUE JUL 31 1981

JUL 24 1981 REC'D

Library, University of California, Davis

Series 458A

61877 | QP501
Biochemische zeitschrift. | B54
v.26

Biochemische zeitschrift
QP501
B54
v.26

A.
S. 37.
Ascoli, ...
alimentär...
Acetonurie. ...
Bacmeister. Unte...
Cholesterinausscheidu...
lichen Gallen. S. 223.
Bang, Ivar. Untersuchungen ü...
die Guanylsäure. S. 293.
Baum, Fritz. Über eine einfache Darstellung von reinem Cyanamid. S. 325.
Buchner, Eduard und Hugo Haehn. Über eine Antiprotease im Hefepreßsaft. S. 171.
Charnass, D. siehe v. Fürth und Charnass.
Cohn, M. siehe Liefmann und Cohn.
Fränkel, Sigmund. Über Lipoide. X. S. 41.
— — Desgl. XI. S. 44.
— — Desgl. XII. S. 53.
Freund, Ernst und Gisa Kaminer. Über die Beziehungen zwischen Tumorzellen und Blutserum. S. 312.
Friedmann, M. siehe v. Fürth und Friedmann.
Fürth, O. v. und D. Charnass. Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittlung der daraus abspaltbaren Aldehydmenge. S. 199.
— und M. Friedmann. Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente. S. 435.
— und Emil Lenk. Über einige Versuche zum Abbaue der Cholsäure. II. S. 406.
Jacob... ...DICAL
munisatorisch... ...
Entwicklung anrege... ...
substanzen. S. 333.
— Über das Verhalten der Sperma- und Eienzyme bei der Befruchtung und ersten Entwicklung. S. 336 u. 536.
Kaminer, Gisa siehe Freund und Kaminer.
Kondo, Kura. Zur Kenntnis d. Chondroitinschwefelsäure. S. 116.
Kondo, Kenro. Zur Kenntnis der in Essigäther löslichen Stoffe tierischer Organe und ihres Verhaltens bei der Autolyse. I. S. 238.
— — Desgl. II. S. 243.
— — Desgl. III. S. 252.
Lebedew, A. v. Bemerkungen zu den „Studien über Kataphorese von Fermenten und Kolloiden“ von H. Iscovesco. S. 221.
Lenk, Emil siehe v. Fürth und Lenk.
Liefmann, H. und M. Cohn. Beiträge zur Hämolyse durch Lipoide. S. 85.
Loeb, Jacques. Über die Hemmung der Giftwirkung von Hydroxylionen auf das Seeigelei mittels Cyankalium. S. 279.

...ür
...kens und
...nur u. Hans
...er. Der Grund-
...d Nahrungsbedarf des
...gs gemäß Untersuchungen
...s Gasstoffwechsels. S. 14.
Stanewitsch, E. siehe Palladin und Stanewitsch.
Stauber, A. siehe Glaeßner und Stauber.
Trunkel, Hans. Über Leim und Tannin. S. 458.
— — Über das optische Drehungsvermögen des Leims. S. 493.
Wolf, C. G. L. und Mc Kim Marriot. Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff im Blut. S. 165.

...Über Phos-
...d Schwefelsäure-
...von Kohlenhydraten. S. 514.
— — Über die Phosphorylierung von Eiweiß und die Bindung d. Phosphors in den natürlichen Phosphorproteinen. S. 529.
Palladin, W. und E. Stanewitsch. Die Abhängigkeit der

61877 QP501
Biochemische zeitschrift. B54
v.26

Biochemische zeitschrift
QP501
B54
v.26

PERIODICAL
61877

PAGE NOT AVAILABLE

PAGE NOT AVAILABLE

PAGE NOT AVAILABLE